

***I nuovi farmaci antiaggreganti: attualità e prospettive
degli inibitori del recettore P2Y12***

Autore: Costanza Musumeci

-INDICE-

I Introduzione
Le malattie cardiovascolari	3
La Sindrome Coronarica Acuta (SCA)	4
Ischemia	6
Aterosclerosi	7
Cenni di Anatomia	8
Patogenesi dell'aterosclerosi.....	10
Fattori di Rischio Aterosclerotico.....	11
La teoria del danno endoteliale	12
Le Piastrine	13
Morfologia e ultrastruttura	14
Biochimica	16
Fisiologia.....	18
Piastrine e coagulazione.....	19
Piastrine ed Aterosclerosi	20
Tecniche di screening per il monitoraggio dell'attività piastrinica.....	23
 II Le Terapie.....	33
Tecniche Microinvasive chirurgiche.....	34
Terapie farmacologiche	35
1.inibitori del recettore della trombina PAR-1	36
2. inibitori del complesso glicoproteico IIb/IIIa.....	38
3. inibitori della PDE.....	41
4. inibitori dei recettori del TXA2.	42
5. inibitori della ciclossigenasi-1 (COX-1 inibitori)	43

III. Gli inibitori dei recettori purinergici P2Y12 dell'ADP	
Il recettore P2Y12	50
Biochimica del recettore.....	51
Anormalità congenite nel recettore P2Y12:	54
IV. Gli inibitori irreversibili.....	
1.Ticlopidina	55
Farmacocinetica.....	56
2.Clopidogrel	57
Farmacocinetica.....	57
Studi Clinici.....	60
La “resistenza” al Clopidogrel	61
3.Prasugrel	80
Farmacocinetica.....	81
Studi clinici	82
V. Gli inibitori reversibili	
4.Ticagrelor	85
Farmacocinetica.....	86
Studi Clinici.....	87
Avvertenze Particolari	88
5.Cangrelor	90
Farmacocinetica.....	91
Studi clinici	92
6.Elinogrel	93
Studi pre clinici	94
Studi clinici.....	95
VI. Direzioni Future.....	96
VII. Conclusioni	99
BIBLIOGRAFIA.....	100

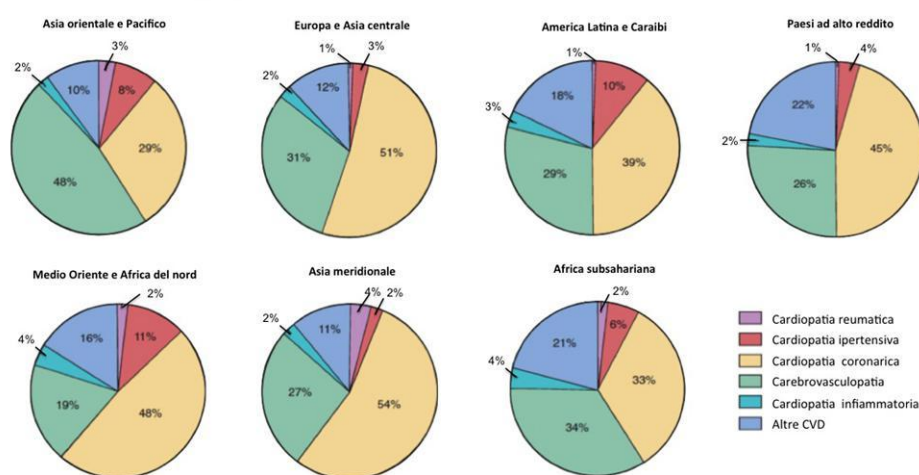
I.INTRODUZIONE

Le Malattie Cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari sono di gran lunga la prima causa di morte nella Ue, secondo i dati Eurostat del 2013. Colpiscono il 50% più dei tumori: 418 ogni centomila abitanti contro 279. Sono poi gli uomini più delle donne ad essere soggetti a malattie mortali. In particolare gli over 65, quando l'incidente cardiovascolare ne uccide 2.198 contro 1.736 donne ed i tumori 1.505 a fronte di 794 femmine.

L'ambito di maggiore incidenza è determinato dalle arteriopatie coronariche responsabili di una serie di manifestazioni cliniche che sono genericamente definite Sindromi Coronariche acute (ACS). Fra queste, l'Infarto acuto del Miocardio (AMI) rappresenta la forma più grave.

FIGURA 2. Mortalità cardiovascolare per cause specifiche nelle varie regioni.



(Modificata da Bonow RO, et al. Malattie del cuore di Braunwald, IX ed. Elsevier Masson, Milano 2012)

Le ACS costituiscono pertanto uno dei problemi socio-economici, clinici ed organizzativi più complessi con i quali la medicina odierna deve confrontarsi; possiamo individuare tre elementi essenziali che costituiscono un sistema di riferimento che tutti i Paesi dovrebbero mettere in atto e potenziare:

- a) monitoraggio dell'esposizione (fattori di rischio)
- b) monitoraggio degli effetti (morbilità e mortalità)
- c) risposta dei servizi sanitari, che comprende anche la capacità a livello nazionale di prevenzione, di politiche e programmazione, di infrastrutture, di risorse umane e di accesso all'assistenza sanitaria essenziale, farmaci compresi.

La sindrome Coronarica Acuta (ACS) (*Crea et al. 2000*)

E' la manifestazione clinica più grave della malattia aterosclerotica delle coronarie (coronaropatia). Questo termine generico viene usato per descrivere il dolore toracico associato a due diversi quadri clinici:

L' ANGINA INSTABILE e l' INFARTO MIOCARDICO ACUTO. Questo dolore è dovuto a un insufficiente apporto di sangue al muscolo cardiaco a causa dell'ostruzione completa o parziale (coagulo) di un'arteria coronarica.

1. L' ANGINA INSTABILE è un dolore toracico improvviso correlato al cuore che si verifica di solito quando si è a riposo o a seguito di un modesto sforzo fisico. Le persone che soffrono di angina instabile, spesso la descrivono come una sensazione di pesantezza o di costrizione toracica, dolore o pressione, o una pienezza o bruciore al petto. Essa può anche essere accompagnata da dolore al braccio o l'avambraccio sinistro. Queste manifestazioni cliniche in genere sono autolimitanti e non durano per più di 20 minuti ma tendono a ripetersi più volte nell'arco della stessa giornata.

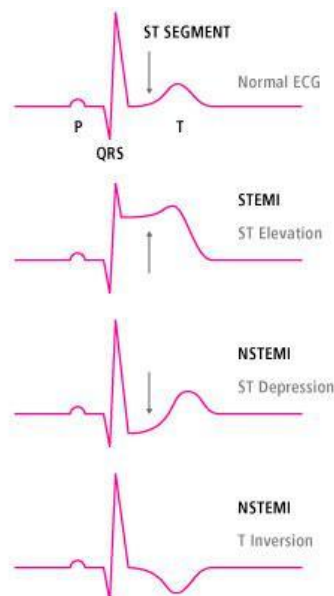
2. L' INFARTO MIOCARDICO ACUTO è il termine medico per l'attacco cardiaco, che si verifica quando l'afflusso di sangue ad una parte del muscolo cardiaco (il miocardio) è notevolmente ridotto o interrotto. Clinicamente si esprime con un dolore toracico prolungato (> 20 minuti) che insorge a riposo e non regredisce spontaneamente.

Se la necrosi interessa il 25-40% del tessuto del miocardio, l'infarto può complicarsi con edema polmonare acuto e/o shock cardiogeno.

Secondo i criteri clinici, elettrocardiografici e dei markers cardiaci ematologici la sindrome coronarica acuta viene classificata in tre manifestazioni cliniche diverse come prognosi e approccio terapeutico:

1. infarto miocardico con sopraslivellamento del tratto ST (STEMI): si tratta dell'infarto più grave, dovuto all'occlusione completa e stabile del vaso coronarico. E' seguito dalla caratteristica elevazione degli indici di necrosi miocardica e dalle caratteristiche alterazioni elettrocardiografiche.

2. infarto miocardico senza sopraslivellamento del tratto ST (NSTEMI): è l'infarto meno pericoloso, dovuto ad un'occlusione incompleta o temporanea del vaso coronarico. In questo caso il livello degli indici di necrosi miocardica è superiore alla norma, ma manca il caratteristico quadro elettrocardiografico dell'infarto.



© 2008, Bayer Schering Pharma AG
www.thrombosisadviser.com

Entrambi i quadri descritti sono caratterizzati da necrosi del tessuto miocardico a valle dell'ostruzione e conseguente liberazione di enzimi specifici nel torrente circolatorio: troponina, isoforma CK-MB dell'enzima creatina-cinasi (CK), lattato-deidrogenasi (LDH), alanina-transaminasi (ALT) e aspartato-transaminasi (AST). La loro rilevazione nel sangue è indice di lesione del muscolo cardiaco.

3. Angina instabile: in questo quadro clinico rientrano varie tipologie di angina: a riposo, ad esordio recente e in crescendo, tutti sintomi che possono precedere l'infarto miocardico. In questa manifestazione della sindrome coronarica acuta tutti i markers biochimici, in presenza o meno di variazioni nell'elettrocardiogramma, sono normali.

Un problema comune quando un paziente ha una sindrome coronarica acuta senza elevazione del segmento ST(NSTEMI) è decidere se si tratta di un attacco di cuore in atto o se invece il paziente è affetto da angina instabile. La Misurazione degli enzimi cardiaci, che riflettono il danno del muscolo cardiaco, è uno strumento importante nel rendere questa distinzione, al fine di optare per la migliore strategia d'azione

SPECIFICI	INIZIO	PICCO	DURATA
Mioglobina	2h	2-5h	2°-3° giorno
CPK	3-6h	Entro 24h	
CPK-MB	3-6h	15-24h	4-6° giorno
SGOT	6-8h	1-2 giorno	5-14 giorni
TROPONINA T	10-24h		10-14 giorni
LDH tot.	12-24 h	48 h	
VES	2°-3° giorno	4°-5° giorno	Anche >2 mesi
GLICEMIA	4h		
PCR	(v.n. < 0.8 mg/dL)	24h	

L'ischemia (*Rang et al 2005*)

La patogenesi ischemica accomuna tutte le condizioni cliniche comprese dalla Sindrome Coronarica acuta. Si tratta di una condizione in cui si verifica una discrepanza tra il fabbisogno e l'apporto di ossigeno al miocardio. Le cause dell'ischemia cardiaca sono nel 90% dei casi di natura coronarico - ostruttiva, anche se il cuore può temporaneamente soffrire la carenza di sangue in condizioni normali sotto sforzo. Le placche riducono progressivamente il lume del vaso e quindi il flusso ematico. La placca, inoltre, può generare ulteriori complicazioni con formazione di trombi e occlusione acuta, parziale o totale, del lume. L'aterotrombosi è il risultato della rottura della placca che può risultare sia spontanea ed improvvisa, causata dalla sua instabilità intrinseca, sia traumatica in seguito a danno meccanico durante un intervento di angioplastica con o senza stent.

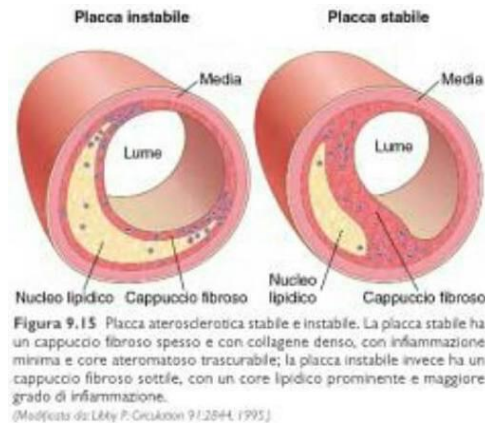
L'aterosclerosi (*Göran et al 2005*)

Arteriosclerosi significa letteralmente "indurimento delle arterie" è un termine generico che indica l'ispessimento e la perdita di elasticità della parete arteriosa.

La malattia aterosclerotica può esser considerata un'inflammatione cronica derivante dall'inserzione tra lipoproteine modificate, monociti-macrofagi, linfociti T e i normali costituenti della parete arteriosa. L'accumulo di lipidi dell'intima delle arterie e la proliferazione di particolari tipi di cellule, tra cui macrofagi, cellule muscolari lisce e fibroblasti, avviano la formazione della placca ateromatosa.

L'ateroma o placca, cioè una deposizione rilevata, focale, fibro-adiposa della parete arteriosa, è formata da tre elementi: cellule (muscolari lisce, macrofagi e linfociti T), matrice extracellulare (collagene, fibre elastiche e proteoglicani) e depositi di lipidi intra ed extracellulari. Le percentuali di tali elementi variano nelle diverse lesioni. Strutturalmente individuiamo un centro (*core*) lipidico (prevalentemente colesterolo) circondato da un cappuccio fibroso (cellule muscolari lisce, collagene, matrice extracellulare), l'area in cui il cappuccio si salda alla parete vasale (spalla della lesione) è ricca di linfociti T, cellule muscolari lisce cariche di lipidi, fibrina, trombi

e proteine plasmatiche. Frequentemente più placche convergono a dare masse di dimensioni ancora maggiori.



L'accrescimento della placca, che si sviluppa in maniera lenta e subdola, tende a restringere il lume del vaso, causando una stenosi. La placca ateromatosa può andare incontro a una serie di modificazioni che risultano nella cosiddetta lesione complicata:

- calcificazione: deposizione di cristalli di calcio a livello della capsula fibrosa.
- l'ulcerazione della superficie luminale della placca, che determina l'entrata in circolo dei detriti cellulari del "core lipidico", producendo microemboli.
- Fessurazioni o ulcerazioni della superficie della placca determinano trombosi. I trombi possono essere incorporati nella placca, occludendo il vaso in situ, oppure possono essere trasportati in circolo, andando ad occludere vasi distanti.
- emorragie per rottura del vaso interessato dall'ateroma o dei microvasi che irrorano la placca.

La coronopatia è la principale complicanza dell'arteriosclerosi e i dati epidemiologici di mortalità generalmente riflettono la mortalità per cardiopatia ischemica (IHD).

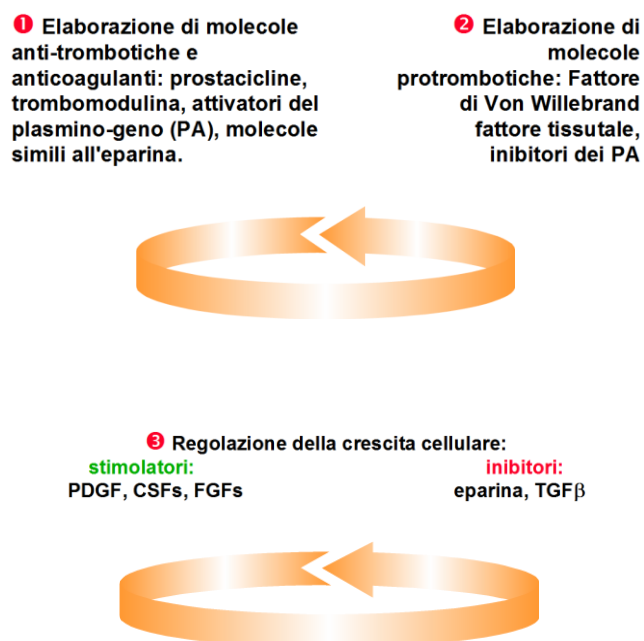
I fattori di rischio

È ormai noto che vari sono i fattori concomitanti all'eziopatogenesi dell'aterosclerosi, in base all'origine sono state individuate due classi:

COSTITUZIONALI	GENETICI
fumo di sigaretta	difetti genetici
iperlipidemia	familiarità
ipertensione	invecchiamento
diabete	sexo maschile

Le teorie Patogenetiche classiche sono due: aterogenesi secondaria a proliferazione intinale in risposta al danno endoteliale cronico e aterogenesi causata da iperlipidemia. La teoria moderna le incorpora entrambe, integrandole con i fattori di rischio sopracitati.

Fisiologicamente l'endotelio risponde alle richieste funzionali dell'organismo:



Nell'aterosclerosi il funzionamento dell'endotelio è anormale, a causa di uno sbilanciamento tra sostanze vasocostrittrici e vasodilatanti a favore delle prime. La progressione delle lesioni è causata dall'interazione di lipoproteine modificate, macrofagi derivati dai monociti, linfociti T e cellule della parete arteriosa.

Il "danno" endoteliale pertanto non è necessariamente di tipo anatomico-fisico, ma può consistere anche in un'alterata funzionalità endoteliale.

Ad oggi sono state evidenziate due cause principali di danno endoteliale:

- Alterazioni emodinamiche: (che si generano anche in condizioni di funzione circolatoria normale); le placche infatti si sviluppano prevalentemente in corrispondenza degli osti dei vasi che si originano dall'aorta, in corrispondenza delle zone di biforcazione e lungo la parete posteriore dell'aorta addominale, tutte aree caratterizzate da **flusso** turbolento con ridotto sforzo di taglio (il flusso laminare protegge invece dall'aterosclerosi, impedendo l'infiammazione e facendo esprimere geni protettivi)
- Effetti avversi dell'ipercolesterolemia

In generale alla formazione di un ateroma concorrono tre fasi fondamentali:

- attivazione endoteliale in seguito a danno endoteliale anatomico o disfunzionale
- lesione intermedia: la placca fibrosa
- lesione avanzata: maturazione della placca ateromatosa

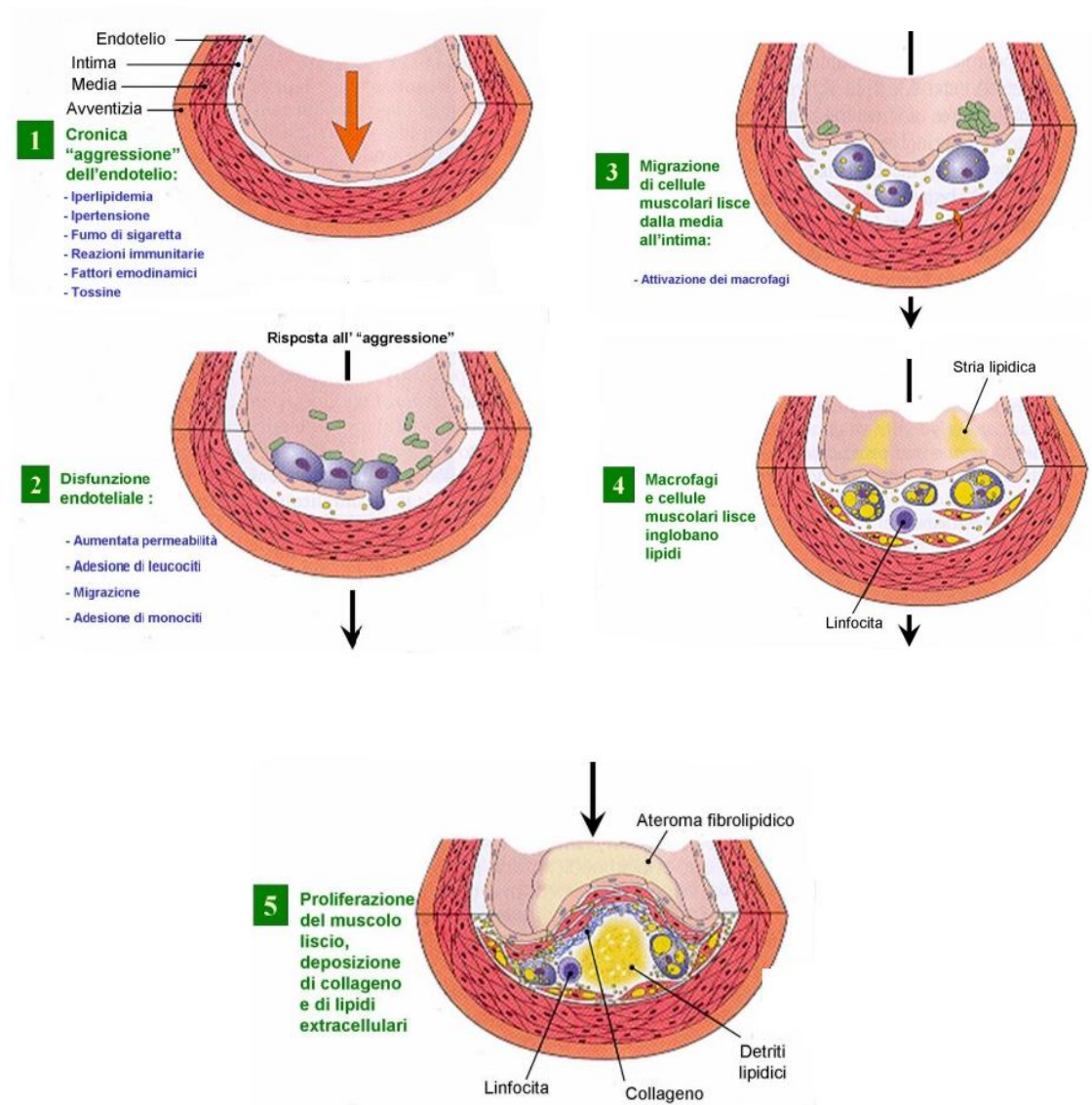
A seconda dell'agente eziologico, la formazione dell'ateroma conosce una patogenesi diversa, ma che con il progredire e l'amplificarsi del fenomeno tende ad uniformarsi richiamando nel sito le stesse cellule e dando origine agli stessi fenomeni:

1. Penetrazione di LDL nella tonaca intima della parete vasale in seguito a maggiore permeabilità endoteliale
2. Ossidazione e condensazione delle LDL e delle Apolipoproteine a apolipoproteine B100 (es:lecitina viene trasformata in isolecitina chemiotattica per i macrofagi).

3. Stimolazione delle cellule endoteliali a produrre citochine pro infiammatorie che richiamano leucociti e monociti (ed VCAM-1), penetrazione delle cellule mononucleate nell'intima richiamate da fattori chemiotattici (MCP-1)
4. attivazione delle piastrine con produzione di:
 - fattori chemiotattici (che determinano il richiamo di monociti circolanti e di cellule muscolari lisce).
 - fattori di crescita e altre citochine che determinano la proliferazione ed eventualmente differenziazione delle cellule
5. trasformazione dei macrofagi in cellule schiumose per internalizzazione delle LDL ossidate
6. formazione della stria lipidica

Se lo stimolo infiammatorio persiste la stria lipidica progredisce verso forme aterosclerotiche più complesse (placca fibro lipidica):

1. migrazione di cellule della muscolatura liscia che secernono matrice extracellulare (collagene, PGAG, elastina.) e formano un cappuccio fibroso che separa il *core* lipidico dal lume vasale
2. Amplificazione della risposta infiammatoria attraverso il richiamo di Linfociti T in seguito alla formazione di anticorpi contro LDL



3. secrezione di fattori di crescita che stimolano la proliferazione delle cellule della muscolatura liscia (IL-1, TNF, IFN- γ) e amplificano il processo infiammatorio

La placca, a differenza della stria, protrude nel lume vasale determinando un ostacolo al flusso ematico.

La destabilizzazione della placca è dovuta alla formazione di un trombo intraluminale. Tale trombosi si sviluppa in presenza di una lesione o fessurazione della placca con conseguente esposizione intravasale di materiale protrombotico ed attivazione piastrinica. La lesione della placca è probabilmente dovuta ad una degradazione del cappuccio fibroso per rilascio di enzimi proteolitici (metalloproteinasi) da parte dei macrofagi attivati.

Le caratteristiche che favoriscono la rottura delle placche sono:

- *core* lipidico di grandi dimensioni;
- capsula sottile;
- alta densità di macrofagi attivati (che distruggono il tessuto connettivo);
- contenuto ridotto di SMC.

La rottura è il risultato dell'interazione di forze locali emodinamiche e meccaniche. La probabilità dell'evento ischemico dipende dal numero di lesioni predisposte alla rottura, anche se è sufficiente la rottura di una sola lesione in un punto strategico per portare alla morte di un individuo. I vasi più colpiti sono: il tratto sottorenale dell'aorta addominale, le coronarie, le arterie poplitee, le carotidi interne e i vasi del circolo di Willis. In genere l'aterosclerosi è generalmente più grave a livello dell'aorta addominale rispetto all'aorta toracica.

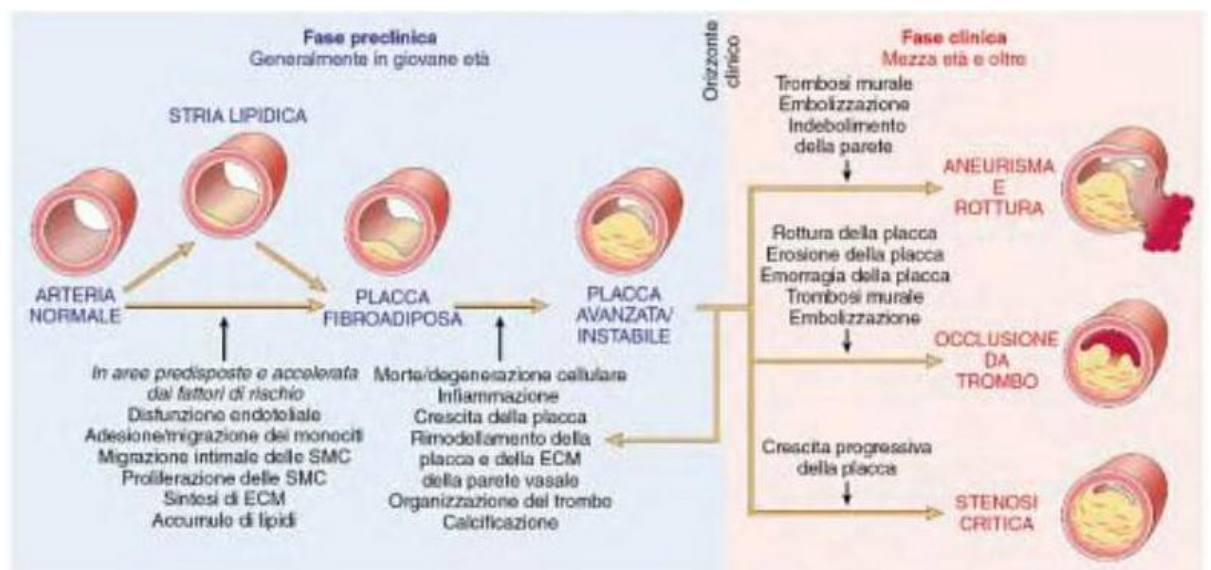
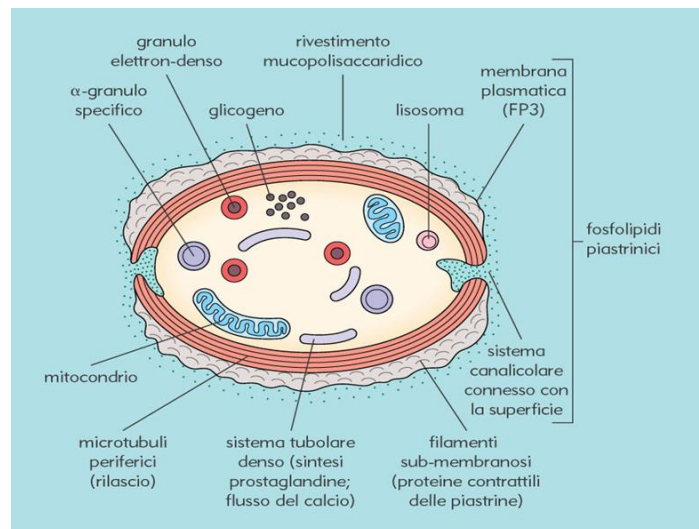


Figura 9.14 Storia naturale, quadro istologico, patogenesi e quadro clinico dell'aterosclerosi. ECM, matrice extracellulare; SMC, cellule muscolari lisce.

Le Piastrine (*Andrew et al 2009*)

Dette anche trombociti non possono esser considerate vere proprie cellule perché sono solo una porzione di esse in quanto derivano dalla frammentazione, nel midollo osseo, dei megacariociti che a loro volta si formano da cellule staminali emopoietiche attraverso varie tappe moltiplicative e differenziative.



Sono prive di nucleo ed hanno forma ovale o rotondeggiante con il diametro di circa 300nm. Sono presenti alla concentrazione di 150.000-400.000/ μ l nel sangue circolante. Al termine del loro ciclo vitale che dura 5-9 giorni sono fagocitate dai macrofagi della milza e dalle cellule di Kupffer del fegato.

La produzione delle piastrine è regolata da vari fattori di crescita, tra i quali IL-3, l'eritropoietina, il GM-CSF, IL-6, IL-11, il MK-CSF e la trombopoietina, quest'ultima regola anche il numero di piastrine circolanti grazie ai recettori presenti sulla loro membrana

Nel citoplasma delle piastrine sono presenti vari granuli, tra i principali noti:

- Granuli densi: serotonina, peptidi chemiotattici, ADP, ATP calcio, magnesio, FP V
- granuli α : fibrinogeno, collagene, beta-tromboglobulina, trombospondina, vWf, PF4, PAF, PDGF, fibronectina, albumina
- lisosomi: enzimi idrolitici di vario tipo

Non avendo il nucleo non possono esercitare alcuna attività biosintetica, tuttavia sono fornite di un complesso corredo enzimatico che permette loro di esercitare diverse attività metaboliche.

Sulla superficie delle piastrine troviamo diversi recettori specifici:

	Recettore	Ligando
Integrine	GPIa/IIa ($\alpha 2\beta 1$)	Collagene
	GPIc/IIa ($\alpha 6\beta 1$)	Laminina
	GPIc*/IIa ($\alpha 5\beta 1$)	Fibronectina
	GPIIb/IIIa ($\alpha 2b\beta 3$)	Fibrinogeno, fattore di Von Willebrand-vWF, fibronectina e vitronectina
Complesso	GPIb-IX-V	vWF
	GPVI	Trombospondina - TSP
	GPVI	Collagene

Le piastrine hanno diverse funzioni:

□ **Emostasi:** esse sono dotate della capacità di aderire ai margini dei vasi e di aggregarsi formando il cosiddetto trombo bianco piastrinico; facilitano inoltre la formazione di fibrina liberando importanti fattori della coagulazione e partecipano alla retrazione del coagulo.

□ **Infiammazione:** oltre a svolgere un ruolo nell'emostasi, le piastrine liberano anche sostanze biologicamente attive che hanno un ruolo nella risposta infiammatoria. Ammine vasoattive, quali la serotonina e l'istamina, possono contribuire ad iniziare la risposta infiammatoria; inoltre i neutrofili e i monociti producono sostanze che attivano le piastrine, promuovendone l'aggregazione e inducendo la liberazione di nuove sostanze vasoattive.

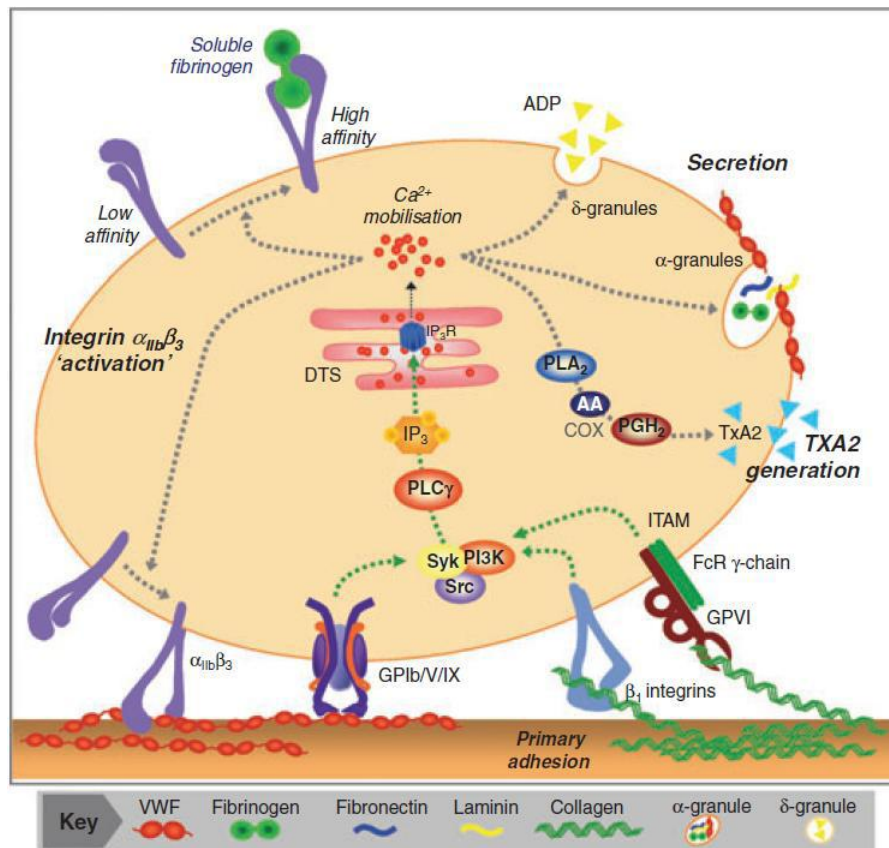
□ **Fagocitosi:** le piastrine fagocitano batteri e piccole particelle e legano le endotossine collaborando alla detossificazione del plasma. Il materiale estraneo di piccole dimensioni è fagocitato attraverso il sistema di canali esistente sulla membrana.

Fisiopatologia dell'emostasi

Con il termine di emostasi si comprendono tutti quei meccanismi fisiologici che intervengono per evitare perdite di sangue. Il processo avviene attraverso l'intervento sincronizzato di numerosi sistemi fisiologici correlati tra loro. Si possono schematicamente descrivere quattro fasi:

- Fase vascolare: subito dopo la lesione si ha una vasocostrizione locale grazie ad un fattore che è l'endotelina e la riduzione del flusso ematico,
- Fase piastrinica: con la formazione del "trombo bianco". Questa fase avviene entro pochi minuti dalla lesione e, insieme alla fase vascolare, costituisce il processo noto come emostasi primaria, che in genere è sufficiente a riparare le lesioni capillari.
- Fase coagulativa: nel caso di lesioni più profonde l'emostasi primaria non è sufficiente a riparare il danno, si ha perciò la trasformazione della protrombina in trombina, la quale converte il fibrinogeno in fibrina, formando il coagulo o "trombo rosso".
- Fase fibrinolitica: infine c'è la retrazione del coagulo, grazie ad una proteina contrattile, la trombostenina. Dopo che l'emorragia è stata arrestata, il coagulo viene gradualmente dissolto mediante la degradazione della fibrina in frammenti solubili ad opera dell'enzima plasmina.

La fase dell'emostasi che ci interessa maggiormente è quella piastrinica.



In stato di quiescenza, l'endotelio è in grado di assicurare la fluidità del sangue mediante un complesso meccanismo anticoagulante, dato da un equilibrio tra PGI₂, NO, e TXA₂, mentre, in seguito ad un danno vascolare, le piastrine entrano in contatto con i componenti della matrice extracellulare, questi includono collagene, proteoglicani, fibronectina, glicoproteine e il fattore di von Willebrand (vWF) che, essendo contenuto in vescicole di deposito (corpi di Weibel-Palade) si attiva in condizioni di aumentato *shear-stress*, ossia di stress meccanico dovuto ad un aumento del flusso.

La risposta piastrinica può essere suddivisa in varie fasi:

- 1 adesione e attivazione,
- 2 cambiamento morfologico,
- 3 secrezione dei granuli,
- 4 aggregazione

Il processo di adesione, come pure l'aggregazione piastrinica, dipende dalla presenza di molecole di adesione e recettori che si trovano sulla superficie delle piastrine e che, per la maggior parte, appartengono alla superfamiglia delle integrine, le quali sono composte da due catene peptidiche, alfa e beta.

Principali proteine della superficie piastrinica

Recettore	Ligando
Integrine	
GPIa/IIa ($\alpha 2\beta 1$)	Collagene
GPIc/IIa ($\alpha 6\beta 1$)	Laminina
GPIc*/IIa ($\alpha 5\beta 1$)	Fibronectina
GPIIb/IIIa ($\alpha 2b\beta 3$)	Fibrinogeno, fattore di Von Willebrand-vWF, fibronectina e vitronectina
GPIb-IX-V	vWF
Complesso	
GPV	Trombospondina - TSP
GPVI	Collagene

L'adesione alla matrice extracellulare può verificarsi attraverso i recettori piastrinici per il collagene (GPIa/IIa-GPVI) e il legame con la fibronectina (GPIc/IIa) e la laminina (VLA-6), l'adesione delle piastrine al sottoendotelio è invece consolidata dal vWF che si lega con una parte specifica della sua molecola al collagene e con un altro sito al complesso GPIb/IX, esso gioca un ruolo prioritario in quanto è il solo meccanismo conosciuto capace di stabilizzare l'iniziale adesione piastrinica contro le forze del flusso sanguigno che tenderebbero a separarle.

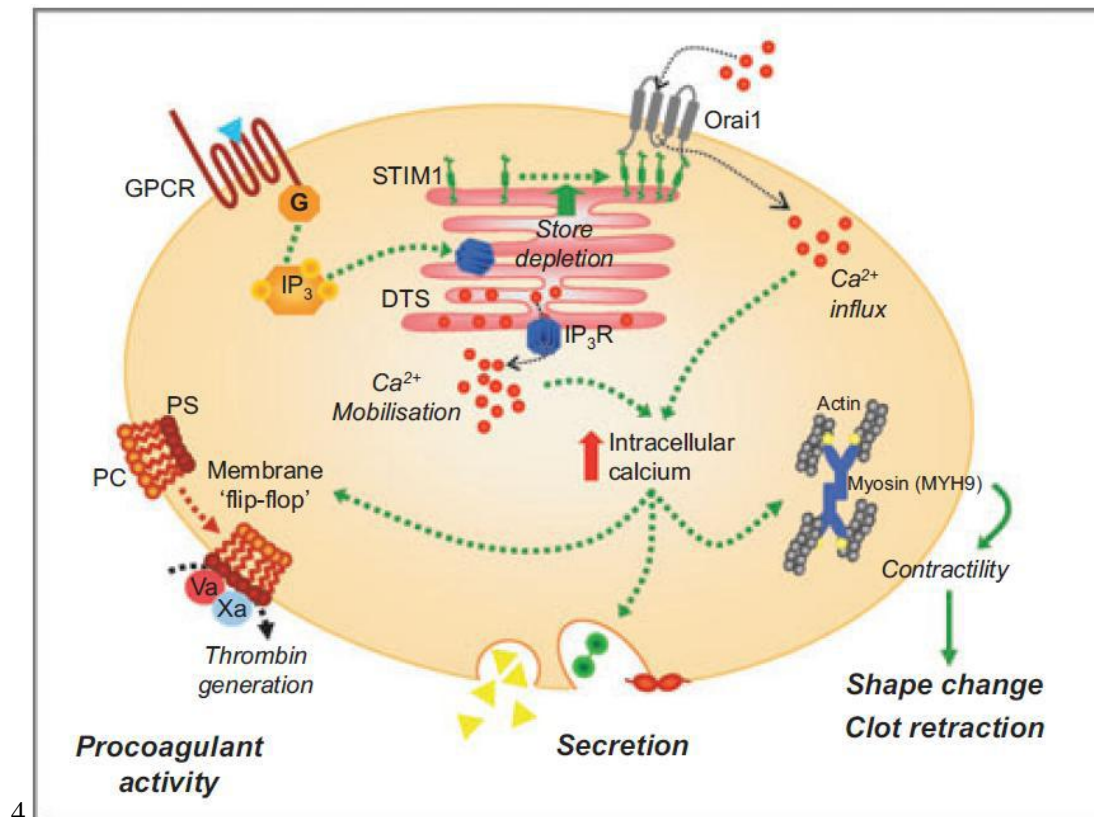
L'esposizione del complesso glicoproteico GPIIb/IIIa, dopo modificazione conformazionale, è l'evento finale comune dell'attivazione piastrinica e costituisce la premessa essenziale per il processo di aggregazione, esso permette il legame del

fibrinogeno, molecola dotata di struttura bipolare che si attacca a due piastrine adiacenti provocandone l'aggregazione.

A parte l'interazione collagene-piastrine, agenti circolanti quali adrenalina, serotonina ADP e trombina possono attivare le piastrine mediante altri recettori specifici presenti sulla membrana:

1. I recettori "protease activated receptors" PAR1 e PAR 4
2. "tromboxane receptor" TP
3. "ADP receptors":
 - P2Y₁ sono accoppiati ad una proteina G (G_q) che attiva la fosfolipasi C (PLC). Vengono idrolizzati i fosfolipidi di membrana per generare inositolo trifosfato (IP₃), che causa la mobilitazione del calcio dai depositi intrapiastrinici, e diacilglicerolo (DAG), che attiva la proteina chinasi C (PKC).
 - P2Y₁₂, è accoppiato con una diversa proteina G (G_i), che attraverso le due sub unità α e $\beta\gamma$ agisce inibendo l'adenilato ciclasi (AC) e attivando la fosfatidilinositolo-3-cinasi (PI3K).

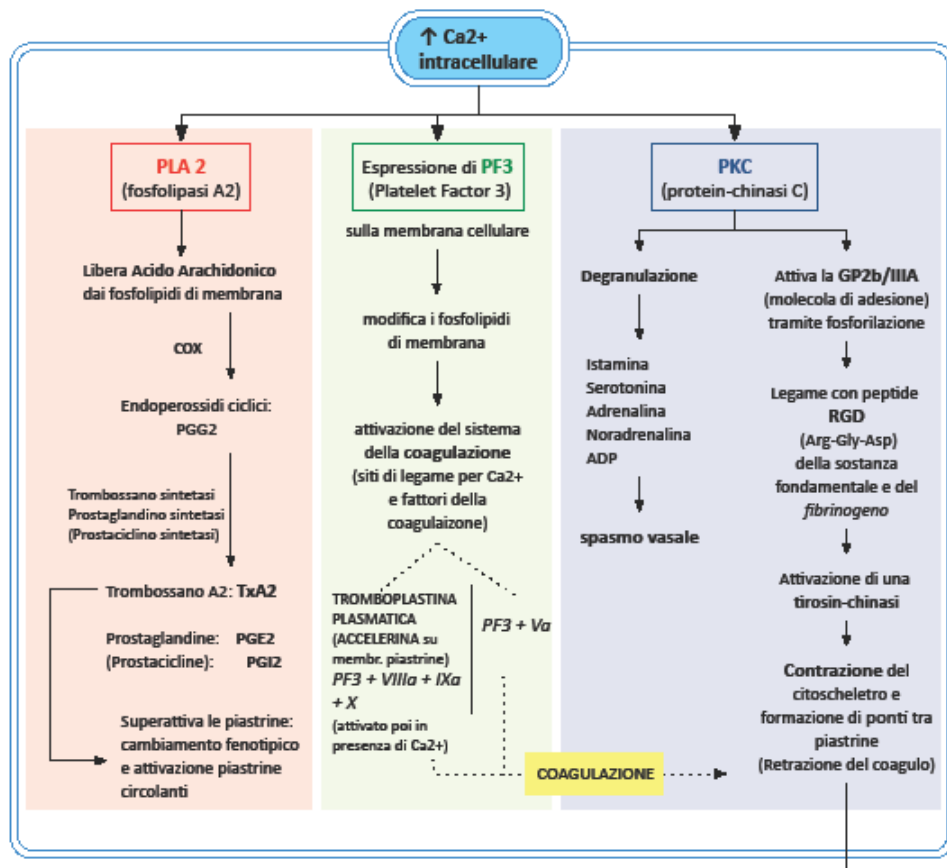
Tutti questi eventi portano all'attivazione della piccola GTPasi *Rap1b* e all'interazione con RIAM (Rap-1 interacting adaptor molecule), una molecola che funge da adattatore. Il complesso RIAM-Rap1b media il legame della Talina (una proteina del citoscheletro) alla coda $\beta 3$ del recettore GPIIb/IIIa. Il legame della Talina e del suo omologo Kindlina (-1e -2) alla coda citoplasmatica dell'integrina attiva il recettore e lo collega al sottostante citoscheletro di actina facendo aumentare la forza adesiva e la coesione piastrinica. La segnalazione integrinica del recettore GPIIb/IIIa è seguita da un'aggregazione potente ed irreversibile, chiamata secondaria. L'aggregazione porta alla formazione del trombo piastrinico, detto anche trombo bianco o trombo primario.



I segnali di attivazione piastrinica generati dall'adesione primaria o dagli agonisti solubili portano, attraverso la via dell'inositolo trifosfato (IP3), alla liberazione del calcio dal sistema tubulare denso che ne rappresenta la riserva intracellulare. La deplezione di calcio da questo deposito è percepita da una molecola d'interazione stromale (STIM1), la quale oligomerizza e attiva il canale del calcio controllato dalla proteina Orai1 localizzata sulla membrana citoplasmatica, consentendo un influsso di calcio extracellulare e amplificando ulteriormente l'attivazione delle piastrine:

1. Viene reso "disponibile" a livello della membrana piastrinica il fattore Piastrinico 3 (F.P.3). Il F.P.3 è un fosfolipide (fosfatidilserina) che nella piastrina a riposo è situato principalmente sul versante interno della membrana plasmatica ed è quindi inaccessibile. Con il *flip-flop* delle fosfatidilserine si ha un riassetto della membrana plasmatica mediante il quale viene esposto all'esterno. Il F.P.3 è implicato in alcune reazioni della coagulazione: infatti la membrana piastrinica particolarmente arricchita di fosfatidil-serina costituisce la superficie negativa ottimale per l'assemblaggio dei complessi multimolecolari critici per l'avvio ed il mantenimento del processo di coagulazione.

2. Si attiva la *myosin light chain kinase* (MLCK) la quale fosforila le catene leggere della miosina, facendole interagire con l'actina. Questa interazione provoca la modificazione della forma delle piastrine e la retrazione del coagulo. Il cambiamento di forma consiste in una veloce trasformazione dalla classica forma discoidale della piastrina circolante a riposo ad una forma irregolarmente sferica con pseudopodi, dapprima corti, poi sempre più lunghi, fino a rendere possibile il contatto tra piastrine vicine, che assumono un aspetto a sfera spinosa. In questo fenomeno è coinvolta la maggior parte delle molecole del citoscheletro. Si ha la destrutturazione del fascio equatoriale dei microtubuli e la loro parziale depolimerizzazione, seguita da polimerizzazione e contrazione dei filamenti di actina associati alle membrane. Sotto la membrana piastrinica e in connessione con l'estremità interna delle glicoproteine si trova il citoscheletro, costituito da microfilamenti, microtubuli e strutture contrattili del sistema actina-miosina, deputate sia al mantenimento della forma ellissoidale delle piastrine a riposo che alla formazione degli pseudopodi e della centralizzazione del granulomero nel corso dell'attivazione piastrinica. I singoli microfilamenti vengono generalmente organizzati e integrati dalle proteine leganti l'actina (ABP, Actine Binding Proteins).
3. rilascio di fattori dai granuli piastrinici (degranulazione), come l'ADP, la serotonina, il calcio e altri fattori importanti per la successiva cascata coagulativa (Fattore IV, Fattore V, Fattore XIII) o la produzione di sostanze quale l'eicosanoide trombossano A₂ (TXA₂). Il rilascio di ADP presenta un doppio effetto, paracrino in quanto il legame con i recettori specifici adiacenti amplifica il processo di attivazione e autocrino poiché l'interazione con recettori purinergici specifici (P2Y₁ e P2Y₁₂) stabilizza il processo.



L'insieme di questi fattori favoriscono il reclutamento di altre piastrine sopra il primo strato, in modo da formare il tappo piastrinico primario, che risulta reversibile fino a quando, con l'attivazione della cascata della coagulazione, viene prodotta trombina.

La Patologia

La principale funzione fisiologica delle piastrine in condizioni di normalità è l'emostasi, ma sottoposte a condizioni fisiopatologiche le piastrine possono provocare trombosi, processo patologico in cui un aggregato piastrinico e/o un coagulo di fibrina occlude un vaso sanguigno.

Tre fattori principali predispongono alla formazione del trombo, la cosiddetta triade di Virchow:

- danno endoteliale, che è il fattore principale e può da solo causare trombosi, specialmente a livello del cuore e nella circolazione arteriosa, per esempio dove si è verificato un infarto del miocardio o valvuliti, sulla superficie di una placca aterosclerotica ulcerata o in vasi danneggiati da traumi o infiammazioni;
- alterazione del flusso sanguigno, la turbolenza contribuisce alla trombosi arteriosa e cardiaca causando danno o disfunzione endoteliale, formando correnti che vanno in senso contrario al flusso sanguigno e stasi, principale fattore di trombi venosi
- ipercoagulabilità: contribuisce meno frequentemente allo stato trombotico, ma è comunque un fattore importante, può essere classificata in primitiva o genetica e secondaria o acquisita.

Un trombo arterioso è costituito dal cosiddetto “trombo bianco” formato soprattutto da piastrine e leucociti in una rete di fibrina. E’ generalmente associato all’aterosclerosi ed il suo principale effetto è quello di interrompere il flusso sanguigno, provocando ischemia o morte del tessuto a valle. Il trombo venoso invece è costituito dal “trombo rosso” di composizione simile ad un coagulo sanguigno, che staccandosi totalmente o in parte dalla parete può formare un embolo, causando morte o danni rilevanti. La composizione, la velocità di crescita e la modalità di organizzazione del trombo variano in funzione dell’intensità e della durata dello stimolo trombogenico. Il deficit di fattori trombotici e fibrinolitici può influenzare la crescita e l’estensione del trombo; in generale tanto più intenso è lo stimolo, tanto più rapida è la crescita del trombo stesso e tanto maggiore è la componente di fibrina e globuli rossi, che può causare rapidamente l’occlusione completa del vaso in pochi minuti. Più frequentemente però lo stimolo trombogenico non è così intenso da sopraffare questi fattori e la deposizione delle piastrine e quindi la crescita del “trombo bianco” è progressiva negli anni.

Le terapie a base di agenti che inibiscono la funzione delle piastrine si sono dimostrati efficaci nel trattamento della SCA, e nella prevenzione delle complicanze

durante e dopo PCI. A causa delle molteplici vie di attivazione delle piastrine e della loro stretta interazione con la coagulazione le strategie di trattamento ad oggi disponibili si basano non solo sull'inibizione delle piastrine ma anche sull'attenuazione dell'attività pro coagulante, inibizione della sintesi di trombina, e intensificazione della dissoluzione del coagulo.

Queste strategie sono generalmente classificate come: Anticoagulanti, Antiaggreganti e Fibrinolitiche. Il nostro interesse si porrà sui farmaci comunemente utilizzati per i "trombi bianchi", ovvero sugli antiaggreganti piastrinici.

Strumenti di laboratorio per lo screening dell'efficacia degli agenti antiplastrinici

Diversi studi hanno evidenziato una variabilità di risposta interindividuale agli agenti antiaggreganti.

Questi individui sono stati classificati come poco responsivi o resistenti al trattamento. Per meglio identificarli sono stati messi appunto dei test di laboratorio che si basano sulla via di attivazione delle piastrine e sui loro target d'azione.

Il modo migliore per valutare l'efficacia del farmaco sarebbe quello di comparare i risultati dei test prima dell'inizio della terapia e durante la stessa; tuttavia questo non è sempre possibile, poiché spesso si ricorre all'utilizzo di questi farmaci in casi di emergenza e pertanto un confronto pre terapeutico non è possibile.

I diversi test ad oggi disponibili tuttavia non sono coerenti nei risultati e pertanto risulta difficile individuare un valore assoluto, in grado di identificarmi un margine di sicurezza terapeutico.

Il termine resistenza spesso impiegato in passato per identificare quei pazienti che nonostante la terapia presentavano un evento avverso cardiovascolare, è tuttavia inadeguato poiché a livello farmacologico con il termine resistenza si individua un farmaco incapace di colpire il proprio bersaglio terapeutico; sarebbe più opportuno parlare di "fallimento terapeutico".

Questo fenomeno è in realtà osservabile in tutti quei farmaci che, come gli agenti anti aggreganti, vengono impiegati per prevenire patologie multifattoriali.

L'aspirina e le tienopiridine inibiscono solo una via di attivazione dell'aggregazione piastrinica, è pertanto irragionevole aspettarsi che gli agenti antiaggreganti menzionati sia in grado di prevenire eventi clinici in tutti i pazienti a rischio. Pertanto, la definizione di “ resistenza agli antiaggreganti” basata esclusivamente sugli outcomes terapeutici è certamente inaccettabile.

I Test fino ad oggi impiegati si basano sull'evidenza che sia la via di trasduzione del trombassanoA2 (TxA2) che dell' adenosina difosfato (ADP) contribuiscono all'amplificazione della risposta aggregante e sono essenziali per la formazione *in vitro* come *in vivo*. Partendo da questa considerazione molti studi hanno messo appunto diverse tecniche in grado di misurare la funzionalità piastrinica *in vitro* in modo da valutarne il grado di inibizione attraverso il trattamento antiaggregante e in alcuni casi di predirne il verificarsi di eventi aterotrombotici.(Cattaneo et al 2007) (Schrör et al 2011)

Sebbene questo approccio sia giustificabile e razionale si dovrebbe esser consapevoli della variabilità che sussiste da individuo a individuo per quanto riguarda l'importanza delle vie di trasduzione prese in considerazione e la variabilità tra i diversi tipi di test adottati.

Due parametri fondamentali devono esser presi in considerazione quando si va a valutare la funzionalità piastrinica *in vitro* di pazienti in trattamento:

1. La specificità dei test di laboratorio per la via di attivazione piastrinica targata dal farmaco
2. Se il test è effettuato sia prima che dopo la somministrazione del farmaco o meno

L'utilizzo di test molto specifici è auspicabile in quei casi in cui si vuole andare a valutare la risposta farmacologica ad un agente antiplastrinico specifico, l'utilizzo di test aspecifici, sensibili a diverse vie di aggregazione piastrinica non sono adeguati per valutare l'efficacia di un singolo antiaggregante; tuttavia questi risultano più efficaci nel valutare e predire il rischio *di major adverse cardiovascular Events* (MACE).

Come sottolineato precedentemente sarebbe fondamentale comparare i risultati dei test prima della cura e durante così da individuare nello shift di risultato l'efficacia del farmaco.

Poiché sussiste una grande variabilità inter-individuale sull'attività basale delle piastrine, la high platelet reactivity (HPR) delle piastrine misurata durante il trattamento può dipendere sia dall'insufficiente inibizione della normale attività piastrinica sia dall'adeguata inibizione delle piastrine che erano però iper reattive all'inizio.

La distinzione tra questi due scenari risulta possibile solo attraverso l'analisi comparata della situazione pre e durante la terapia, non essendo questo sempre possibile è ormai di consuetudine analizzare esclusivamente l'attività piastrinica durante il trattamento, senza alcuna misura di riferimento precedente alla terapia.

Questo parametro risulta inappropriato quando si deve ottenere informazioni sulla risposta individuale al farmaco, resta comunque un buon mezzo per stimare il rischio cardiaco legato all'attivazione/aggregazione piastrinica.

Sapere se HPR sia dovuto al fallimento terapeutico o meno risulta clinicamente rilevante in quanto si può intervenire attraverso un incremento della dose terapeutica, il passaggio ad un altro farmaco della stessa famiglia o con l'aggiunta di altri farmaci.

Gli studi più innovativi che si avvalgono di test specifici hanno riguardato pazienti in cui HPR è dovuta a bassa responsività alla terapia, i valori di cut-off considerati sono identificati sulla base di pazienti a rischio di futuri MACE e non.

L'ottenimento di questi dati implica tuttavia la necessità di un campione molto ampio di analisi, ottima gestione dell'esperimento e studi *ad hoc*.

La variabilità di questi test è molto elevata e molti sono i fattori concomitanti che intervengono:

- Il ritmo circadiano
- Comorbilità
- Stile di vita
- Abitudini alimentari

Andiamo ad analizzare le principali metodiche di laboratorio sottolineando in quali casi possono esser sfruttate e il loro grado di attendibilità:

Alcuni test per la funzionalità piastrinica impiegati per valutare la reattività piastrinica durante il trattamento.

Bleeding time

Light transmission aggregometry (LTA)

Impedance aggregometry

Whole blood platelet aggregation measured by platelet counting The PFA-100® system

Ultegra Rapid Platelet Function Assay (RPFA)-VerifyNow®

Flow cytometry

Cone-and-Plate(let) Analyzer (CPA)

Thromboelastography (TEG)

Serum thromboxane B2 (TxB2) levels

❖ **Bleeding time:**

Poco riproducibile ed influenzato da diversi fattori fisiologici quali funzionalità piastrinica, numero delle piastrine, fattori del plasma, globuli rossi, trofismo della parete vasale.

Presenta scarsa sensibilità ad anomalie delle piastrine sia genetiche che acquisite in corso di terapia, pertanto non dovrebbe esser impiegato per valutare l'effetto degli agenti antiaggreganti

❖ **Light transmission aggregometry (LTA):**

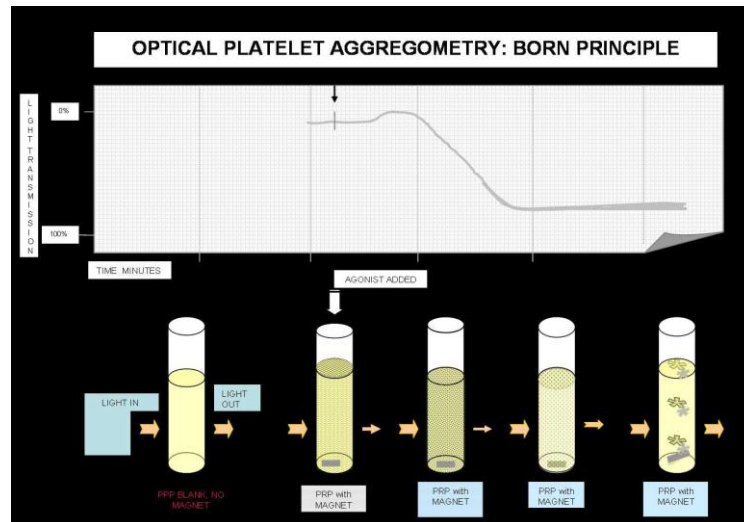
Misura l'incremento nella trasmissione di luce attraverso una sospensione di piastrine che si forma quando le piastrine si aggregano in risposta ad un agonista.

Non è consigliato per analizzare la risposta ad ASA o Tienopiridine , presenta inoltre diverse limitazioni:

- È molto lento.
- È influenzato da diverse variabili
- Il risultato ottenuto in un laboratorio è difficilmente comparabile con quello di un altro a causa di una carenza di standardizzazione

- È strettamente legato alla concentrazione di agonista e al tipo di anticoagulante impiegato per il campionamento di sangue

LTA viene principalmente impiegata in alcuni studi per predire gli eventi clinici dopo PCI.

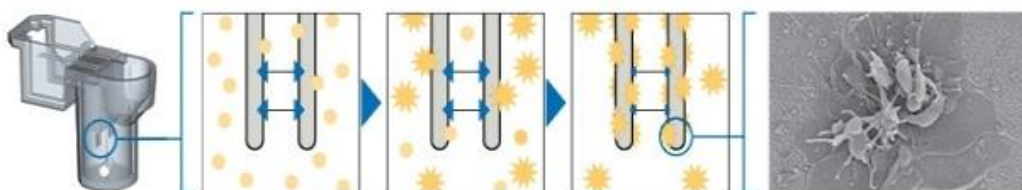


❖ Impedance aggregometry

Impedance aggregometry misura i cambiamenti nell'impedenza elettrica che si ha quando le piastrine, in seguito all'aggiunta di un agonista, formano un aggregato agli elettrodi immersi in un campione di sangue intero diluito.

The instrument Multiplate® (Verum Diagnostica, Munich, Germany) è lo strumento maggiormente impiegato negli studi che misurano i livelli piastrinici di pazienti in terapia con Clopidogrel.

La tecnica di analisi risulta più semplice della LTA, tuttavia permangono certi limiti analizzati in precedenza.



In particolare, le variabili pre analitiche, le quali possono alterare i risultati delle analisi indipendentemente dallo strumento impiegato.

Lo strumento può esser impiegato, non solo per analizzare il rischio di MACE ma anche il rischio di sanguinamento.

❖ **Whole blood platelet aggregation misurato con il contatore di piastrine**

Questo è un metodo semplice e molto sensibile per studiare il fenomeno dell'aggregazione piastrinica.

Si basa sul principio che il numero di piastrine libere diminuisce nell'intero sangue in funzione degli aggregati formati in seguito ad aggiunta di un agonista.

È più sensibile dell'LTA, poiché può intercettare anche piccoli aggregati, formati anche da 2-3 piastrine.

I risultati scientifici per quanto riguarda l'esperienza con gli effetti del Clopidogrel sono pochi.

❖ **The PFA-100® system**

PFA-100® (Dade Behring, Marburg, Germany) può esser rapportato ad un bleeding time in vitro: un campione di sangue anticoagulato è aspirato attraverso un capillare (che mima la resistenza di una piccola arteria) e fatto passare attraverso una membrana di 150 µm (che mima la parete danneggiata) in fine è fatto reagire con un agonista (ADP o collagene + noradrenalina).

L'Apertura è gradualmente occlusa e di conseguenza il sangue scorre sempre più lentamente o eventualmente si ferma (il tempo di chiusura è registrato).

Il metodo automatico, rapido e con poca necessità di campione è estremamente semplice da usare.

È sensibile alle malformazioni di origine genetica, anche severe, delle piastrine, risulta meno efficace nel determinare invece malformazioni indotte.

È poco sensibile all'analisi delle terapie a base di Clopidogrel.

❖ **Ultegra Rapid Platelet Function Assay (RPFA)-VerifyNow®**

The Ultegra Rapid Platelet Function Assay (RPFA)-VerifyNow® (Accumetrics, San Diego, CA, USA) è un test che misura l'agglutinazione di biglie rivestite da fibrinogeno da parte di piastrine stimulate da un agonista in sangue anti coagulato con citrato. Inizialmente questo test era stato concepito per valutare l'effetto antiplastrinico degli inibitori della GP IIb/IIIa. Successivamente è stato modificato per aumentare la sensibilità e la specificità ai due principali farmaci antiplastrinici, l'ASA (RPFA-Verify-Now ASA) e il Clopidogrel (RPFA-Verify-Now P2Y12). Quest'ultimo è probabilmente più specifico dell'aggregazione piastrinica indotta da ADP, misurata con LTA nel monitorare il trattamento con Clopidogrel.

I risultati sono espressi in PRU (P2Y12 reaction units), i valori più alti corrispondono a maggiore reattività piastrinica (HPR).

Questa tecnica nonostante oggi rimanga la più usata per l'analisi del clopidogrel presenta ancora dei punti di dibattito per quanto riguarda la definizione dei cut off per determinare il rischio di MACE.

VerifyNow è stato scelto come test di laboratorio di riferimento per misurare la funzionalità piastrinica in trials preparati per testare la sicurezza e l'efficacia dei trattamenti personalizzati con Clopidogrel, sebbene i risultati ottenuti siano stati non del tutto soddisfacenti per quanto riguarda il test sulla funzionalità piastrinica.

L'aspetto più negativo rimane comunque l'elevato costo.

❖ **Cone-and Plate(let) Analyzer (CPA)**

Un viscosimetro che misura l'adesione e l'aggregazione piastrinica in un flusso laminare sottoposto ad uno "shear" costantemente elevato.

❖ **Flow cytometry**

Un metodo basato sulla citometria a flusso è il VASP®, (Biocytex, Diagnostica Stago, Asnieres, France) che misura l'inibizione da parte dell'ADP dopo fosforilazione del VASP(fosfoproteina stimolante la vasodilatazione).

Questa via di trasduzione è regolata dal recettore P2Y12 attraverso l'inibizione dell'Adenilato Ciclasi.

Come unità di misura si adopera il PRI (Indice di reattività piastrinica) conosciuto anche come indice di VASP.

In questo caso si va a valutare non l'aggregazione indotta dalla ADP bensì i livelli biochimici di un mediatore che ha attività antiaggregante e che contrasta fisiologicamente l'aggregazione indotta dall'ADP. (Aleil et al 2004)

L'attivazione del VASP avviene, come si mostra in figura 1, attraverso un analogo della PGE1 la PGI₂, pertanto l'attivazione di questa via di trasduzione e l'attenuazione di quella ADP indotta può esser un buon parametro per valutare l'efficacia del clopidogrel o di altri antagonisti del P2Y₁₂.

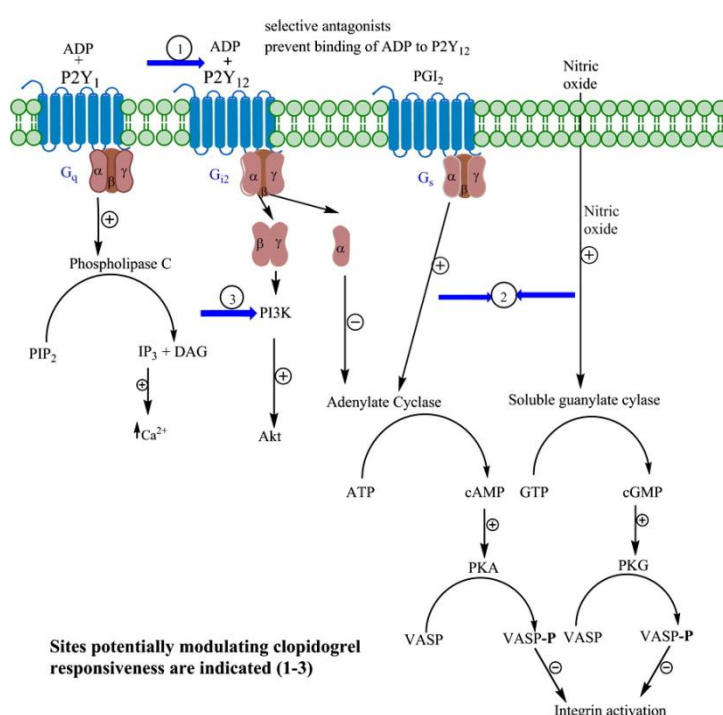


Figura 1- N.L. Hurst, V.B. Nooney, B. Raman, Y.Y. Chirkov, R. De Caterina, J.D. Horowitz - *Vascular Pharmacology*, Volume 59, Issues 5-6, 2013, 152 – 161

Perché il VASP?

La fosforilazione del VASP è fisiologicamente fondamentale per l'organizzazione del citoscheletro di actina, alla base del movimento, dell'adesione, della migrazione cellulare e dell'attivazione dell'integrina GP IIb/IIIa.

La fosforilazione avviene a livello della Ser 157, Ser 239 e Thr 278; e riflette non solo i livelli di cAMP ma anche di cGMP.

In presenza di stress ossidativo infatti la via di trasduzione del cGMP può esser compromessa portando ad uno scompenso nella formazione del VASP-p.

Affinché il VASP-p possa esser considerato un valore di riferimento per valutare l'effetto del Clopidogrel risulta fondamentale che la via presa in considerazione non sia geneticamente o patologicamente alterata, cosa non sempre escludibile in pazienti con resistenza al Clopidogrel.(*Bouman et al 2008*)

$$\textbf{PRI} = [\textbf{MFI (PGE1)} - \textbf{MFI (PGE1+ADP)} / \textbf{MFI (PGE1)}] * 100$$

MFI= intensità della fluorescenza

La misurazione richiede circa 40 minuti, pertanto non può esser impiegata in casi di emergenza ma può trovare applicazione per la valutazione di nuovi dosaggi terapeutici

Una buona inibizione del P2Y₁₂ è associata con bassi PRI (<50%), diversi studi hanno dimostrato come elevati livelli di PRI in pazienti in terapia con clopidogrel o prasugrel, siano correlabili con un maggiore rischio di MACE.(*Freynhofer et al 2012*) Corretti cut off non sono ancora stati definiti chiaramente, poiché molte sono le variabili in gioco (metodo di calcolo, i tempi di analisi considerati).

❖ **Thromboelastography (TEG)**

La tromboelastografia (TEG) misura il cambiamento della viscosità elastica che avviene durante la formazione del coagulo nel sangue intero. Essa è dunque influenzata dalla funzionalità piastrinica, dai fattori della coagulazione, dagli inibitori naturali della coagulazione e dalla fibrinolisi.

❖ **Serum thromboxane B2 (TxB2) levels**

La misurazione nel siero del metabolita stabile trombossano B2 (TxB2) riflette la capacità complessiva delle piastrine di sintetizzare TxA₂. Questo è il test più specifico per misurare l'effetto farmacologico dell'ASA. La misurazione del metabolita del TxB₂, 11-deidro-trombossano B₂ urinario, è un altro test che permette di determinare la sintesi in vivo del trombossano A₂.

Nonostante la varietà di prove disponibili, non esiste un test standard di riferimento per misurare l'attivazione piastrinica. Le definizioni di resistenza all'ASA e al

Clopidogrel variano a seconda di quale test è utilizzato e studi mirati a valutare l'efficacia clinica di questi farmaci hanno scoperto che alcuni pazienti venivano identificati come *non responder* da un metodo di analisi, mentre risultavano *responder* con altri.

II. LE TERAPIE:

1. Tecniche Microinvasive chirurgiche
2. Terapie Farmacologiche

1.

Da alcuni anni si affianca alla terapia farmacologia una tecnica chirurgica nel trattamento delle coronopatie, due sono le tecniche maggiormente impiegate:

- **Lo stent**
- **By-pass coronarico**

Indipendentemente dal fatto che si esegua un impianto di stent o un intervento chirurgico di by-pass, il trattamento della coronaropatia mira a ripristinare il flusso sanguigno all'interno di un'arteria ostruita entro valori prossimi alla norma. Entrambe le opzioni richiedono procedure specializzate e dispositivi specifici.

L'impianto di Stent prende il nome di Angioplastica coronarica; con la sigla PCI (*percutaneous coronary intervention*) ci si riferisce principalmente alle arterie coronarie in cui si interviene per permettere il flusso di sangue al cuore. Ci sono diversi tipi di procedure di PCI, tra cui:

- **angioplastica con palloncino** - un palloncino viene gonfiato all'interno dell'arteria bloccata per aprire l'area bloccata. (*Figura 1*)
- **aterectomia** - l'area bloccata dentro l'arteria è "rasata" via da un piccolo dispositivo per la fine di un catetere.

- **angioplastica laser** - un laser utilizzato per "vaporizzare" il blocco nell'arteria.
- **stent dell'arteria coronaria** - una bobina piccola è espansa all'interno della arteria bloccata per aprire l'area bloccata e viene lasciato in sede per tenere aperta l'arteria.

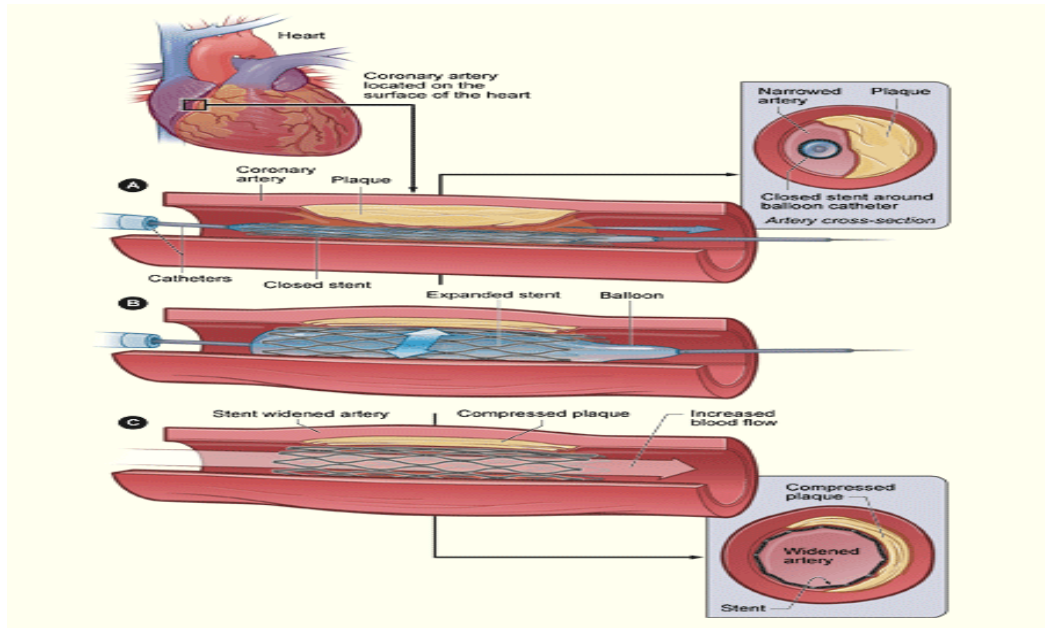


Figura1- inserimento di uno stent a palloncino

L'impianto di stent è una procedura minimamente invasiva durante la quale uno stent e un palloncino vengono utilizzati in combinazione per comprimere i depositi a placca presenti all'interno dell'arteria coronaria e risolvere o alleviare così un problema cardiaco. Una volta impiantato, lo stent rimarrà permanentemente in sede.

Stent a rilascio di farmaco

Oltre a fornire supporto strutturale all'arteria coronaria, alcuni stent possiedono un rivestimento medicato che aiuta a prevenire la restenosi del vaso. Sia gli stent in metallo nudo sia quelli a rilascio di farmaco si dimostrano efficaci nel ripristinare la pervietà delle arterie coronarie.

Effetti Avversi

In alcuni rari casi, l'utilizzo di stent può dare luogo alla cosiddetta trombosi da stent, termine con il quale si definisce la formazione di un coagulo di sangue in seguito

all'impianto di stent. In una piccola percentuale di pazienti con stent, la viscosità del sangue può aumentare favorendo l'aggregazione di cellule ematiche e la conseguente formazione di minute masse, o coaguli. Tali coaguli possono bloccare il flusso del sangue all'interno dell'arteria e causare un infarto cardiaco o addirittura la morte. La trombosi da stent può verificarsi sia nei pazienti con stent in metallo nudo sia in quelli con stent a rilascio di farmaco.

Per evitare spiacevoli complicanze è fondamentale affiancare una terapia farmacologica che specialmente nel primo mese dopo l'intervento.

Il verificarsi di eventi avversi durante trattamento con antiaggreganti ed in seguito a PCI è un parametro fondamentale di molti studi per valutare l'efficacia di un farmaco.

I farmaci antiaggreganti oggi disponibili sono molti, tuttavia ad uso clinico, viene ormai abitualmente prescritta una terapia a base di ASA+ Clopidogrel o ASA+ Prasugrel.

2.I farmaci Antiaggreganti Piastrinici

Un ideale agente antiplastrinico dovrebbe andare a bloccare in maniera selettiva i meccanismi trombogenici senza interferire con la normale funzione piastrinica, purtroppo nessun farmaco presente sul mercato si attiene a queste indicazioni. I farmaci attualmente utilizzati sono generalmente ben tollerati, ma possono presentare una limitata efficacia, effetti collaterali legati a problemi di sanguinamento e fenomeni di “resistenza”, per questo motivo la ricerca continua a sviluppare nuovi e più efficaci farmaci antiplastrinici e antitrombotici.

Sulla superficie endoteliale delle piastrine sono presenti numerosi recettori fondamentali per gli stimoli fisiologici. Questo ha permesso lo sviluppo di diversi farmaci immessi in commercio aventi vari meccanismi d'azione (Figura-1):

1. inibitori del recettore della trombina PAR-1

2. inibitori del complesso glicoproteico IIb/IIIa
3. inibitori della PDE
4. inibitori dei recettori del TXA₂.
5. inibitori della ciclossigenasi-1 (COX-1 inibitori)
6. inibitori dei recettori purinergici P2Y₁₂ dell'ADP.

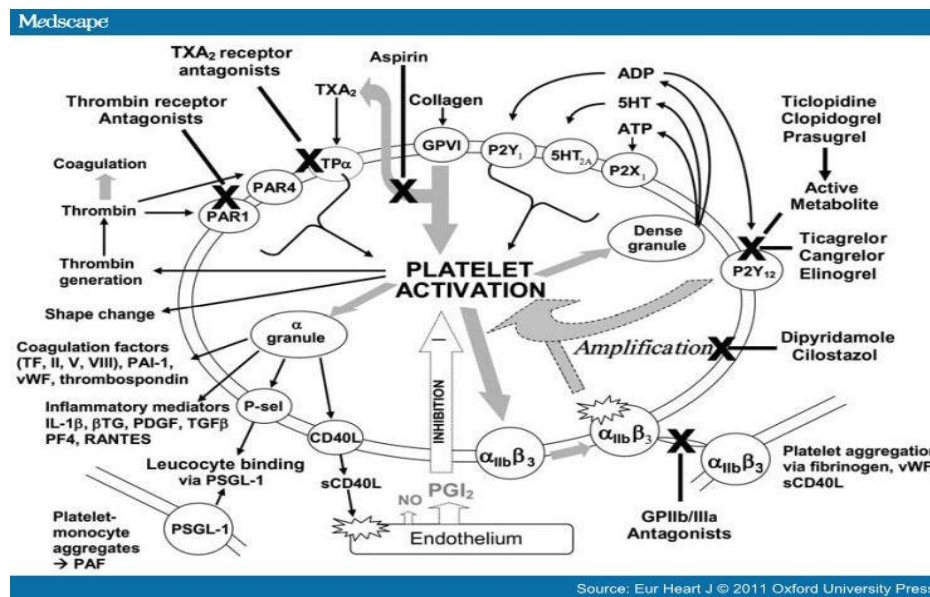


Figura 1-Rappresentazione schematica dei bersagli d'azione dei principali farmaci antiaggreganti piastrinici

Dopo un breve excursus sulle prime cinque classi di farmaci la nostra attenzione si focalizzerà sugli inibitori dei recettori P2Y₁₂ e in particolare sui nuovi farmaci orali e non ad oggi disponibili evidenziando peculiarità sul loro profilo d'azione in termini di sicurezza/efficacia.

1. INIBITORI DEL RECETTORE PAR-1

Molti degli eventi cellulari indotti dalla trombina e dai peptidi trombino-mimetici sono mediati dall'attivazione proteolitica dei recettori PARs. La famiglia dei recettori

attivati dalle proteasi è composta da quattro elementi: PAR-1 , PAR-2 , PAR-3 e PAR-4.

Questi recettori sono costituiti da sette domini idrofobici transmembrana a elica: tre intra- e tre extra-cellulari, una coda intra-cellulare C-terminale ed un lungo dominio extra-cellulare N-terminale. L'attivazione dei PARs richiede il clivaggio del dominio NH₂-terminale extra-cellulare, rivelando una nuova sequenza peptidica (ligando ancorato) capace di legarsi ai siti entro il secondo anello extra-cellulare del recettore stesso. Il PAR-1, il PAR-3 ed il PAR-4 vengono clivati ed attivati dalla trombina, mentre il PAR-2 viene ritenuto un recettore per gli enzimi tripsino-simili; comunque la tripsina può anche clivare ed attivare il PAR-4.

I PARs sono recettori accoppiati a proteine G eteromeriche diverse e ciò permette l'attivazione in parallelo di più vie di trasduzione del segnale.

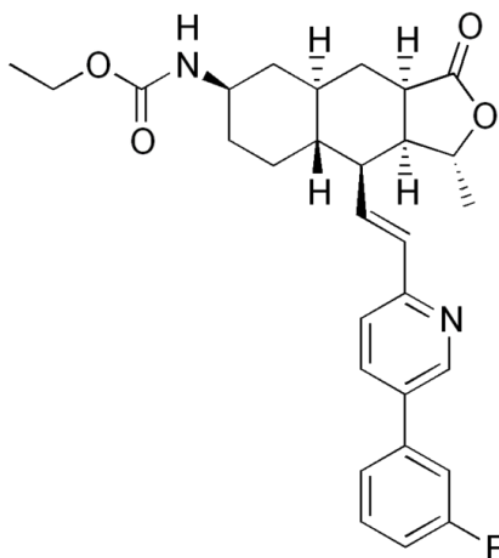
Il PAR-1 è espresso in molti tipi di tessuti e di cellule, come piastrine, monociti, linfociti T, cellule della muscolatura scheletrica, della muscolatura liscia vascolare e non, fibroblasti, cellule endoteliali ed epiteliali, ghiandole esocrine, cheratinociti, osteoblasti e cellule delle placche aterosclerotiche.

Il PAR-1 è un recettore costituito da 425 amminoacidi e la sua attivazione avviene a seguito del clivaggio del suo dominio extracellulare aminotermine Arg-Ser; ciò provoca lo smascheramento di un nuovo gruppo terminale che funge da ligando ancorato, in quanto lega intramolecolarmente un dominio del recettore stesso. Le funzioni della trombina relative al processo infiammatorio, alla rigenerazione tissutale ed all'emostasi coinvolgono l'attivazione del recettore PAR-1.

Il PAR-4 è relativamente insensibile alla trombina, con una EC₅₀ cinquanta volte più alta rispetto al PAR-1; questo suggerisce che il PAR-4 funzioni come un recettore a bassa affinità per la trombina e si attivi solamente quando questa raggiunge elevate concentrazioni. Tale ipotesi è confermata da uno studio che dimostra come un anticorpo per il PAR-4 blocchi l'attivazione delle piastrine ed il segnale per il Ca²⁺ solo in presenza di un'alta concentrazione di trombina. Un altro lavoro ha mostrato come il segnale per la liberazione del Ca²⁺, indotto dalla trombina, avvenga con una modalità bifasica in cui la fase iniziale è mediata rapidamente dal recettore PAR-1, sostenuto successivamente dall'azione del recettore PAR-4 che interviene nell'ultima fase dell'attivazione piastrinica. Quindi il PAR-1 è il recettore predominante coinvolto nell'aggregazione piastrinica e nel processo di coagulazione, mentre il

PAR-4 sosterrà l'aggregazione piastrinica, indotta dalla trombina, nel momento in cui il PAR-1 viene rapidamente inattivato.

Essendo quindi il PAR-1 coinvolto in molti processi tra i quali la risposta pro Infiammatoria nell'aterosclerosi, farmaci in grado di inibire questo recettore potrebbero apportare notevoli benefici nella riduzione dell'avanzamento aterosclerotico e degli eventi ischemici trombo-mediati senza interferire eccessivamente nell'emostasi primaria.



Vorapaxar (prima SCH 530348) e atopaxar sono due piccoli inibitori peptidici, il primo è un alcaloide isolato dalla corteccia della magnolia australiana in grado di inibire il recettore PAR-1 quasi completamente. Studi clinici hanno dimostrato che dosi fra 5-40 mg di Vorapaxar sono associate con una sensibile inibizione di più del 90% dell'aggregazione piastrinica indotta dai PAR-1 per più di 72h. Vorapaxar è ancora sotto studi di fase III per dimostrare un ruolo vero e proprio in pazienti con ACS.

Vorapaxar e in generale gli inibitori PAR-1 potrebbero esser associati a maggiori rischi di sanguinamento sebbene alcuni studi abbiano dimostrato che a differenza degli anticoagulanti questi farmaci non prolunghino il tempo di sanguinamento, di proto trombina o trombina.

Ulteriori studi sono comunque necessari per attestarne l'efficacia e la sicurezza.

Recentemente è stato messo appunto anche PZ-128 un inibitore PAR-1 sviluppato come antiaggregante durante gli interventi coronarici.

Si tratta di una molecola denominata pepducin, composta da una porzione proteica coniugata con un lipide (derivato del palmitato) grazie al quale riesce a passare la membrana plasmatica.

PZ-128 sembra poter modulare l'aggregazione piastrinica inibendo il recettore PAR-1 in maniera reversibile senza alcuna influenza sul recettore PAR-4.

Questa particolare molecola potrebbe portare dei vantaggi riducendo significativamente il rischio di sanguinamento associato a Vorapaxar.

2.INIBITORI DELLA GLICOPROTEINA IIb/IIIa

GPIIb/IIIa è essenziale per la fisiologica aggregazione delle piastrine. L'attivazione del complesso GPIIb/IIIa svolge un ruolo fondamentale nel legame col fibrinogeno, il fattore di von Willebrand, la fibronectina e la vitronectina, la sua attivazione tramite la sequenza arg-lys-asp (identificata con la sigla RGD) rappresenta la via finale comune per l'aggregazione piastrinica.

L'inibizione di questo recettore è associata con l'induzione della disaggregazione piastrinica, attenuazione dei microembolismi della parete vasale e il rilascio di mediatori vasocostrittori e micro particelle.

I tre farmaci approvati dalla FDA che appartengono a questa categoria (Eptifibatide, Tirofiban, Abciximab) hanno delle caratteristiche in comune: vengono utilizzati per via endovenosa e l'uso è generalmente ospedaliero, la somministrazione viene sempre associata ad acido acetilsalicilico per via orale ed infusioni di eparina non frazionata.

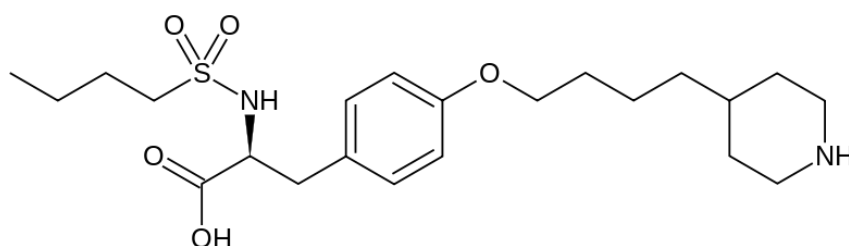
Abciximab (ReoPro) è il frammento Fab dell'anticorpo monoclonale chimerico IgG1 prodotto da una linea cellulare ricombinante in coltura a perfusione continua. Inibisce l'aggregazione piastrinica prevenendo l'attivazione dei recettori GPIIb/IIIa presenti sulle piastrine attivate, inoltre si lega al recettore della vitronectina sulle cellule endoteliali, responsabile delle proprietà pro-coagulanti delle piastrine e delle proprietà proliferative delle cellule endoteliali e muscolari lisce della parete vasale.

La somministrazione di un bolo di 0,25 mg/kg di Abciximab , seguita da un'infusione continua della stessa dose per 12h è capace di inibire l'80% dei recettori GPIIb/IIIa per una durata di circa 48h.

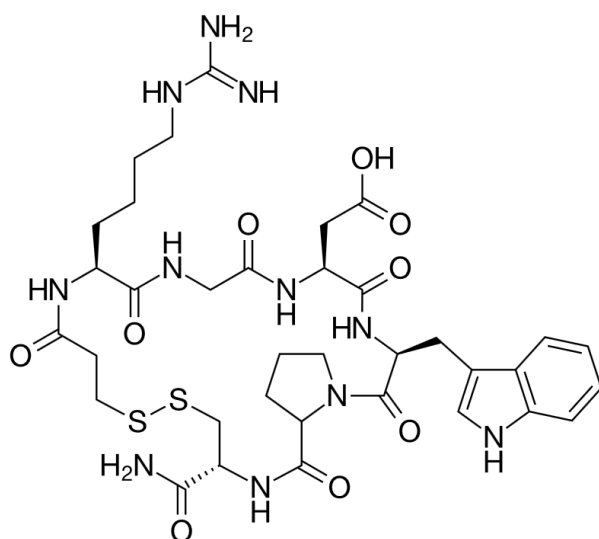
Grazie alla sua elevata affinità per il recettore e nonostante la breve emivita (10 min seguiti da una seconda fase di emivita di 30 min) l'Abciximab è capace di saturare il recettore GPIIb/IIIa per settimane con una redistribuzione graduale tra recettori occupati e nuove piastrine.

Tirofiban è un peptidomimetico derivato della tyrosina, inibitore reversibile dell'aggregazione piastrinica e appartenente alla classe degli RGD (Arg-Gly-Asp) mimetici.

Comparato con L'Abciximab, Tirofiban ha un'affinità minore per il recettore, una più rapida azione e una emivita più breve (90-120 min) sulla base dell'escrezione prevalentemente renale.



L'Eptifibatide (Integrelin) è un eptapeptide ciclico sintetico derivato della barburina, una sostanza rintracciata nel veleno del serpente a sonagli.



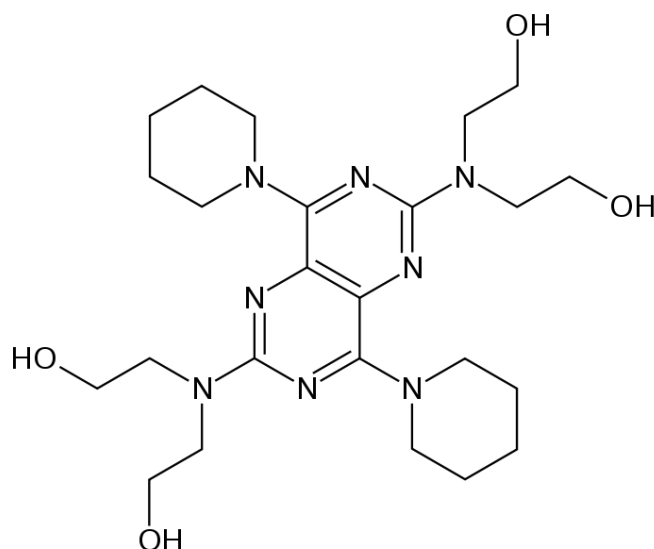
Eptifibatide contiene una sequenza modificata lys-gly-asp che specificatamente lega il recettore GPIIb/IIIa con bassa affinità e rapida azione in maniera strettamente dose dipendente.

Riassunto delle proprietà degli inibitori del recettore GPIIb/IIIa:

	Abciximab	Eptifibatide	Tirofiban
Natura chimica	Frammento anticorpo Fab	Eptapeptide ciclico	Peptide mimetico
Massa molecolare kDa	47,6	0,495	0,832
Specificità recettoriale	Irreversibile	Reversibile	Reversibile
Legame con il recettore	Aspecifico	Specifico per GPIIb/IIIa	Specifico per GPIIb/IIIa
Tempo recupero funzionalità piastrinica	48h	2-6 h	2-6h

Le nuove tecnologie invasive, le innovazioni negli stents e l'incremento nell'uso di altri farmaci fanno sì che l'utilizzo e la necessità di potenti inibitori dell'aggregazione piastrinica sia minore che in passato, pertanto il ruolo degli inibitori del GPIIb/IIIa risulta in qualche modo secondario.

3. INIBITORI DELLA PDE

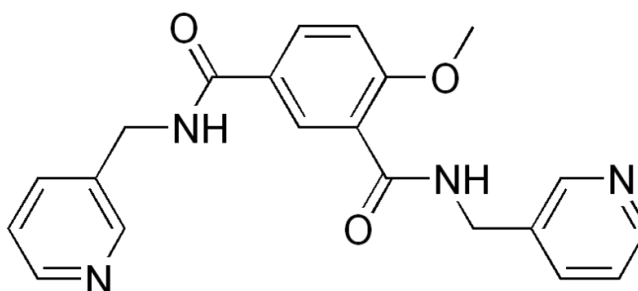


Il Dipyridamolo è un composto pirimidopirimidinico con proprietà coronarodilatanti. Viene indicato in caso di insufficienza coronarica, angina, coronaropatie, profilassi dell'infarto, patologie a livello cardiaco, cerebrale e renale da aumentata aggregabilità piastrinica. E' caratterizzato da un sinergismo di diversi meccanismi d'azione, tutti incentrati sull'aumento dei livelli di AMP ciclico intrapiastrinico.

Innanzitutto è un potente inibitore della fosfodiesterasi (PDE), enzima responsabile della rapida conversione dell'AMP ciclico in AMP. Il Dipyridamolo è anche capace di indurre la liberazione di prostaciclina vasodilatatrice (PGI₂) dalle cellule endoteliali e di potenziarne gli effetti; più recentemente è stato dimostrato che il Dipyridamolo inibisce la captazione di adenosina, inibitore fisiologico della funzione piastrinica, da parte di varie cellule ematiche. L'adenosina così accumulata a livello dei recettori della membrana piastrinica stimolerebbe quindi l'enzima adenilciclasi con conseguente aumento dei livelli di AMP ciclico. I farmaci antiaggreganti piastrinici se utilizzati da soli possono avere una efficacia limitata, per questo spesso più molecole con meccanismi d'azione differenti, vengono combinati tra di loro in modo da potenziarne l'efficacia preventiva.

Da gennaio 2008 è stato lanciato sul mercato italiano un farmaco, associazione tra dipiridamolo e acido acetilsalicilico a rilascio modificato (**AGGRENOX**), indicato nella prevenzione dell'ictus in pazienti con precedenti attacchi ischemici transitori o ictus ischemico completo dovuto a trombosi. Questo farmaco ha il vantaggio di avere un sinergismo di meccanismi d'azione: inibizione delle ciclossigenasi, inibizione delle fosfodiesterasi, inibizione della captazione di adenosina, stimolazione della biosintesi e rilascio di prostaciclina.

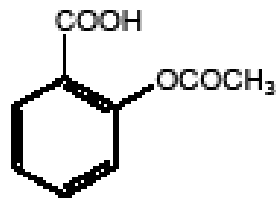
4. INIBITORI DEI RECETTORI DEL TXA₂



La Picotamide monoidrata in commercio dall'87, presenta un profilo farmacologico caratterizzato da attività antiaggregante piastrinica e fibrinolitica, il suo impiego prevalente è nei disordini tromboembolici in cui è indicata un'inibizione della reattività piastrinica e un'attivazione del potenziale fibrinolitico, ad esempio nell'infarto del miocardio, nelle trombosi venose e arteriose, nei disordini cerebrovascolari, nelle embolie polmonari e negli stati aterosclerotici.

La Picotamide è un farmaco antiaggregante ed interviene sulla funzionalità piastrinica attraverso due meccanismi d'azione, infatti va ad inibire sia la trombassano-sintetasi, enzima in grado di convertire la PGH₂ in TXA₂, che ad antagonizzare i recettori TP piastrinici.

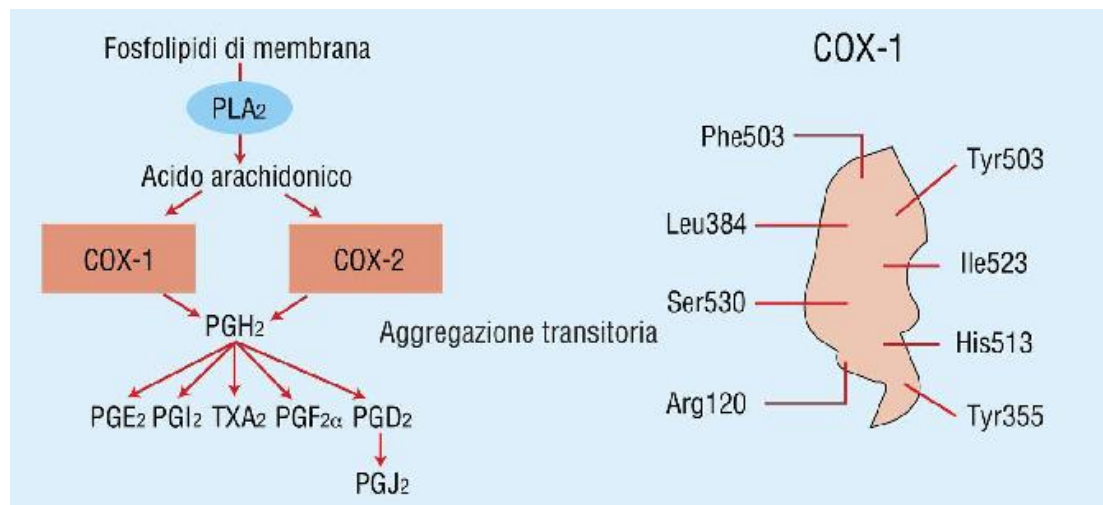
5. INIBITORI DELLA CICLOSSIGENASI-1



Acido acetil salicilico (ASA)

L'Aspirina è l'agente antiaggregante più usato nel trattamento dei problemi cardiovascolari e cerebrovascolari. L'aspirina è rapidamente e ha come bersaglio principale la COX delle piastrine a basse dosi.

La ciclossigenasi(COX) è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la conversione di acido arachidonico (un acido grasso poliinsaturo a 20 atomi di carbonio) in endoperoxido prostaglandinico.

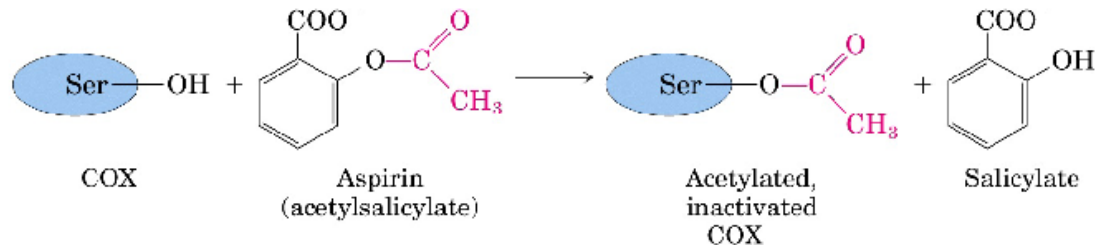


La COX-1 è espressa a livello costitutivo sia nelle piastrine che in molte cellule e permette la produzione di specifiche prostaglandine (PGs), responsabili dell'emostasi vascolare, della protezione della mucosa gastrica e del mantenimento dell'irrorazione sanguigna del rene e del trombossano (TxA₂) a livello piastrinico.

In Alternativa esiste anche una COX-2 la cui espressione è indotta nei processi infiammatori dai fattori di crescita nelle cellule endoteliali, dai macrofagi e dai monociti.

La COX-2 è presente anche nelle piastrine "giovani" e si ritiene possa contribuire alla sintesi del trombossano.

MECCANISMO D'AZIONE:



L'azione dell'Aspirina si esplica su entrambe le COX piastriniche in maniera irreversibile, tuttavia l'acetilazione della COX-1 risulta 166 volte più efficace di quella della COX-2 e avviene con dosaggi più bassi(30 mg/die sono sufficienti per inibire completamente la COX-1 delle piastrine)

Il processo di acetilazione avviene a livello della 529Ser della COX-1 delle piastrine prevenendo il legame dell'AA nel sito catalitico e inibendo tutta una serie di processi a cascata:

- inibizione della produzione di PGH₂
- inibizione della formazione del TXA₂, e pertanto soppressione del meccanismo aggregativo indotto dal TXA₂ per l'intera vita della piastrina.(10-12 giorni)

La porzione salicilica lega anche un secondo sito d'azione della COX-1 (120Arg) che si ritiene contribuisca all'effetto antiaggregante.

L'azione inibitoria sulla COX-2 avviene a livello della Ser516, in questo caso l'AA viene trasformato in acido 12-idrossieicosatetraenoico convertito poi in 15-epossilipossicina A₄ in grado di inibire l'interazione dei leucociti con l'endotelio grazie allo stimolo sul rilascio di NO e pertanto di diminuire l'infiammazione.

Oltre all'effetto sulle COX l'aspirina presenta un certo effetto fibrinolitico, infatti aumenta la permeabilità del coagulo e la sua lisi attraverso l'acetilazione dei residui di Serina della fibrina. È stato dimostrato che questo influenza l'interazione delle piastrine con i neutrofili, gli eritrociti e la superficie endoteliale.(*Rhynn et al 2013*)

È importante sottolineare come L'Aspirina inibisca esclusivamente l'attività della COX-1 e non quella della TxA2 sintetasi, poiché è stato dimostrato che è sufficiente un 20% di residuo d'attività del TxA2 per indurre l'aggregazione piastrinica, è importante raggiungere almeno un 95% di inibizione per osservare un effetto clinico sufficiente dell'Aspirina.

È stato dimostrato che bassi livelli di COX-2 in presenza di Aspirina possono indurre aggregazione piastrinica, questa COX-2 libera può derivare dalle cellule endoteliali, dai monociti e dai macrofagi che, superato l'effetto dell'aspirina in 2-4 ore, possono contribuire alla re sintesi di COX-2 specialmente nei siti di rottura delle placche dove sono in elevavate quantità. La COX-2 può attivare la via trans cellulare di sintesi del TxA2 oltrepassando così l'effetto dell'Aspirina.

L'aspirina è rapidamente assorbita nello stomaco e nel primo tratto dell'intestino. Il picco plasmatico si ha 30-40 minuti in seguito all'assunzione del farmaco e l'inibizione piastrinica è evidente in 1 ora.

Nonostante presenti una emivita di 15-20 minuti, l'inibizione della COX piastrinica è irreversibile e si protrae per tutto l'arco di vita della piastrina.

La metabolizzazione dell'aspirina in acetile e salicilati avviene prevalentemente nel fegato ad opera della carbossiesterasi 2 intestinale .

l'inibizione piastrinica è stata osservata perfino prima dell'apparizione dell'aspirina nella circolazione sistemica suggerendo che l'acetilazione della COX-1 piastrinica avvenga principalmente nel circolo pre-epatico.

La terapia antiaggregante standard con Aspirina prevede la somministrazione quotidiana di 30mg , sufficienti a sopprimere completamente l'effetto della COX1 nelle piastrine, dosi di 75-150 mg sono invece raccomandate nei trattamenti per la prevenzione a lungo termine, mentre in casi di pazienti ad elevato rischio cardiovascolare è consigliata una dose quotidiana di 150-325 mg.

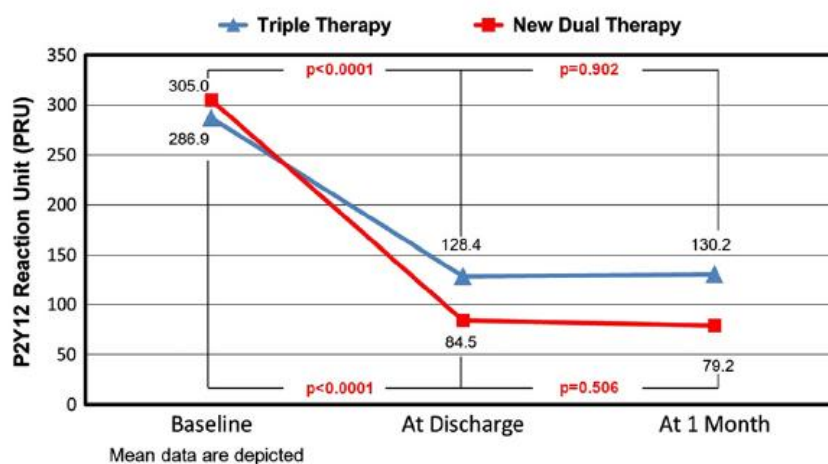
Sono stati riportati diversi casi di variabilità farmacodinamica in risposta alla terapia con ASA, sia dovuti ad interazioni con altri farmaci (NSAIDs e antagonisti H2), sia a co-morbilità(diabete). La resistenza all'ASA riguarda la sua incapacità di interagire con il proprio bersaglio farmacologico(il residuo di serina della COX-1) e di bloccare in modo efficace la produzione TxA2. In alcuni pazienti questo può

essere dovuto ad un disturbo del metabolismo proteico, come per esempio la glicosilazione delle proteine osservato nei pazienti diabetici, che impedisce l'acetilazione della COX-1 piastrinica da parte dell'ASA. Un'altra causa di resistenza può essere la mutazione del gene che codifica per la COX-1. L'inefficienza dell'ASA può infine essere dovuta al tentativo delle piastrine nell'aggirare l'inibizione della COX-1 attraverso meccanismi di compensazione. Ad esempio, nei soggetti sani, la COX-2 è espressa solo da una piccola percentuale (meno del 10%) di piastrine. Tuttavia, l'espressione è notevolmente aumentata (fino al 60% delle piastrine) in condizioni cliniche associate ad un alta rigenerazione delle piastrine. Nonostante l'inibizione della COX-1, la presenza di COX-2 nelle piastrine consente la produzione TxA2 e se in quantità sufficienti causa aggregazione piastrinica.

La terapia con ASA è stata(e in alcuni casi è tutt'ora) una delle scelte principali nel trattamento dei pazienti con ACS o sottoposti a PCI, specialmente per quel riguarda l'associazione con altri farmaci, la Ticlopidina prima il Clopidogrel e il Prasugrel ultimamente.

L'utilizzo di una tripla terapia antiaggregante (TAT) ASA+Clopidogrel+Cilostazolo (un inibitore della PDE) è stata confrontata con una doppia terapia a base di ASA + Prasugrel (DAT) in pazienti con STEMI sottoposti a PCI; i risultati valutati in PRU attraverso il VerifyNow P2Y12 point-of-care assay, hanno evidenziato una certa superiorità della DAT rispetto alla TAT come mostrato in figura-1(Tae-Hyun Yang et al 2013)

figura-1. T.-H. Yang et al. / International Journal of Cardiology 168 (2013) 207-211



III. INIBITORI PURINERGICI DEL RECETTORE P2Y12 dell'ADP.

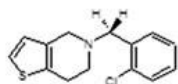
Il recettore P2Y12 è cruciale nel processo di attivazione delle piastrine e rappresenta un target farmacologico effettivo per l'inibizione dell'aggregazione piastrinica e la prevenzione degli eventi aterotrombotici.

I farmaci sviluppati fino ad ora sono principalmente disponibili per OS e ciò li rende molto più adatti ad un regime terapeutico extraospedaliero e ad una terapia cronica.

Fanno parte di questa Classe di Farmaci :

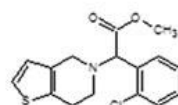
1. Ticlopidina (TIKLID®)
2. Clopidogrel (PLAVIX®)
3. Prasugrel (EFIENT®)
4. Ticagrelor (BRILIQUE® e POSSIA® non in commercio in Italia)
5. Cangrelor
6. Elinogrel

Irreversible P2Y₁₂ inhibitors



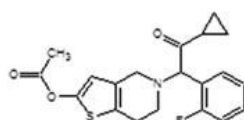
Ticlopidine

5-(2-chlorobenzyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridine



Clopidogrel

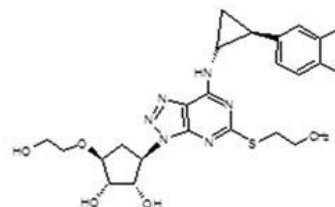
2-(2-chlorophenyl)-2-(2,4,5,6,7,7a hexahydrothieno[3,2-c]pyridine-5-yl)-acetic acid methylester hydrogen sulfate, 7S.



Prasugrel

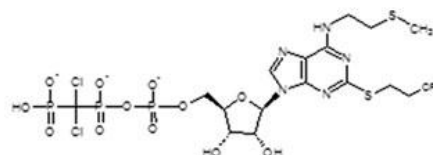
2-acetoxy-5-(α -cyclopropylcarbonyl-2-fluorobenzyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridine.

Reversible P2Y₁₂ inhibitors



Ticagrelor

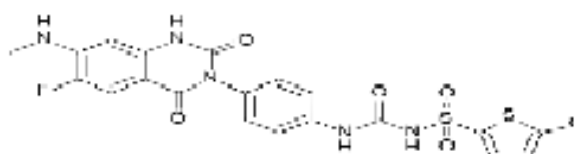
[(1S,2S,3R,5S)-3-{7-[[[(1R,2S)-2-(3,4-difluorophenyl)cyclopropyl]amino]-5-(propylthio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pyrimidin-3-yl]-5-(2-hydroxyethoxy)cyclopentane-1,2-diol]



Cangrelor

N6-[2-methylthio)ethyl]-2-[3,3,3-trifluoropropylthio]-5'-adenylic acid, monoanhydride with dichloromethylenebiphosphonic acid

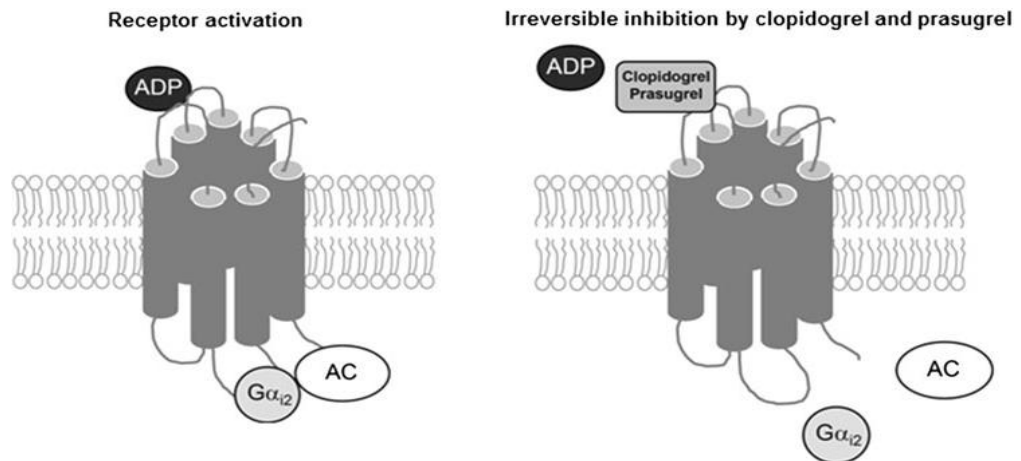
Reversible P2Y₁₂ inhibitor OS and IV



Elinogrel

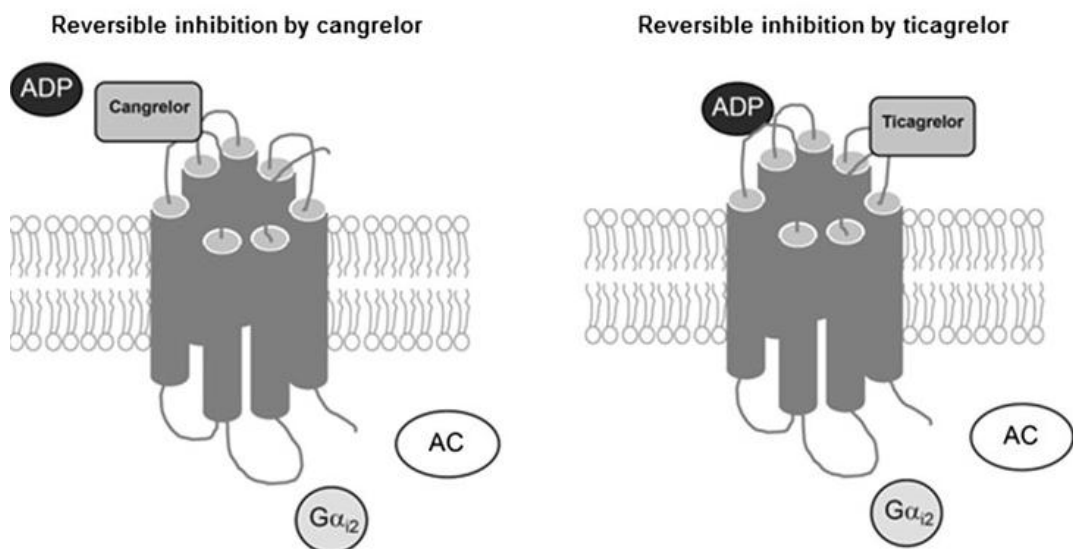
N-[(5-chlorothiophen-2-yl)sulfonyl]-N'-[4-[6-fluoro-7-(methylamino)-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl]phenyl]urea

La Ticlopidina, il Clopidogrel ed il Prasugrel appartengono alla classe delle tienopiridine e sono dei pro-farmaci che legano il recettore in maniera irreversibile,



il Ticagrelor è una ciclopentiltriazolpiridina analogo dell'ADP ad azione diretta e reversibile.

il Cangrelor un analogo dell' ATP ad uso endovenoso sempre ad azione reversibile mentre Elinogrel è un chinazolinione ad azione selettiva, competitiva e reversibile sul recettore P2Y₁₂ ed in più è disponibile sia per OS che per endovena.



Per meglio comprendere il meccanismo d'azione di questi farmaci ed i limiti terapeutici ad essi correlati è importante andare ad analizzare il loro target d'azione.

❖ IL RECETTORE P2Y12:

Il recettore appartiene alla famiglia dei recettori nucleotidici purinergici conosciuti come P2. Di questa famiglia fanno parte due classi di recettori:

- P2X recettori canale ligando-dipendenti (P2x1-P2x7)
- P2Y recettori accoppiati a proteine G

Ad oggi sono noti ben otto tipi di recettori P2Y , che sono stati clonati e caratterizzati (P2Y 1,2,4,6,11,12,13,14), il salto nella sequenza numerica è dovuto ad errori nel riconoscimento di alcuni recettori che sono stati scambiati per appartenenti a questa famiglia o di origine non mammifera p2y3 (indicato con la sigla minuscola perché non umano).

I recettori sono distribuiti tra tessuti, piastrine, placenta, cuore, pareti vascolari, cellule muscolatura liscia, cervello, cellule immunitarie e cellule neurali.

In base all'aspetto farmacologico possono esser suddivisi in :

- Recettori sensibili all' ADP/ATP
- Recettori misti
- Recettori sensibili all' UDP/UTP
- Recettori sensibili all'UDP-glucosio

In fine in base alla loro funzionalità accoppiata a proteine G si suddividono in:

- Gq (P2Y 1,2,4,6,11)
- Gi (P2Y 12,13,14)

Tra i recettori P2 solo il P2X1, il P2Y1 e il P2Y12 sono espressi a livelli significativi nelle piastrine con una maggioranza di concentrazione del P2Y12 seguito dal P2Y1 e dal P2X1.

I due P2Y hanno un ruolo fondamentale nella formazione del trombo; il P2Y1 inizia l'attivazione delle piastrine in risposta alla ADP e partecipa all'aggregazione mediata dal collagene.

Il P2Y1 è accoppiato in particolare ad una proteina Gαq e partecipa alla mobilitazione del Ca⁺⁺ intracellulare inducendo il cambiamento di forma della piastrina e partecipa alla formazione di un primo debole aggregato indotto dall'ATP.

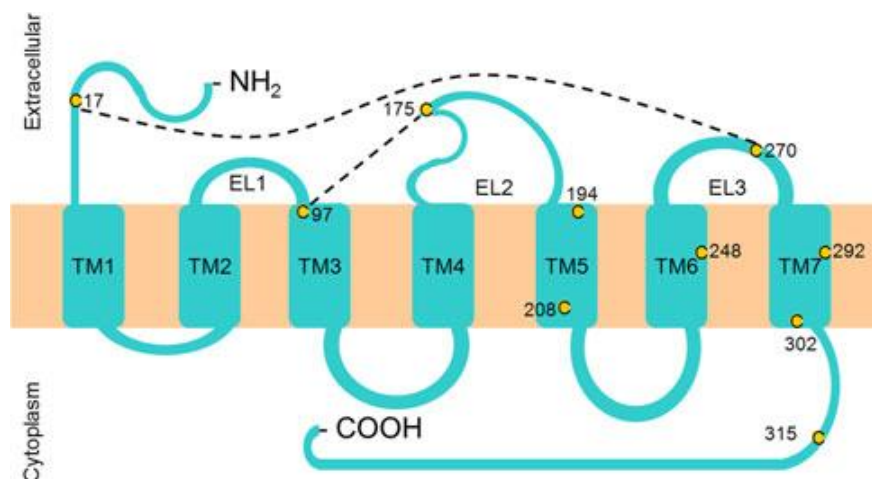
In generale P2Y1 media risposte deboli all'ADP è però cruciale nelle prime fasi dell'attivazione piastrinica ADP o collagene mediata.

Il recettore P2Y12 invece completa ed amplifica l'attivazione e l'aggregazione piastrinica. La sua struttura è stata chiarita nel 2001 attraverso tecniche di "ligand screening" e "expression cloning" sia nei tessuti umani che bovini che di topi e ratti; è presente principalmente a livello piastrinico ma una piccola concentrazione si trova anche nel cervello.

Il recettore è attivato dalla ADP (agonista contenuto all'interno dei granuli piastrinici) e molto potentemente dall'analogo dell'ADP il 2-metil-tio-ADP(2MeSADP). L'ATP, il 2MeSATP e il 2ClATP sono invece degli antagonisti.

Biochimica del recettore P2Y12:

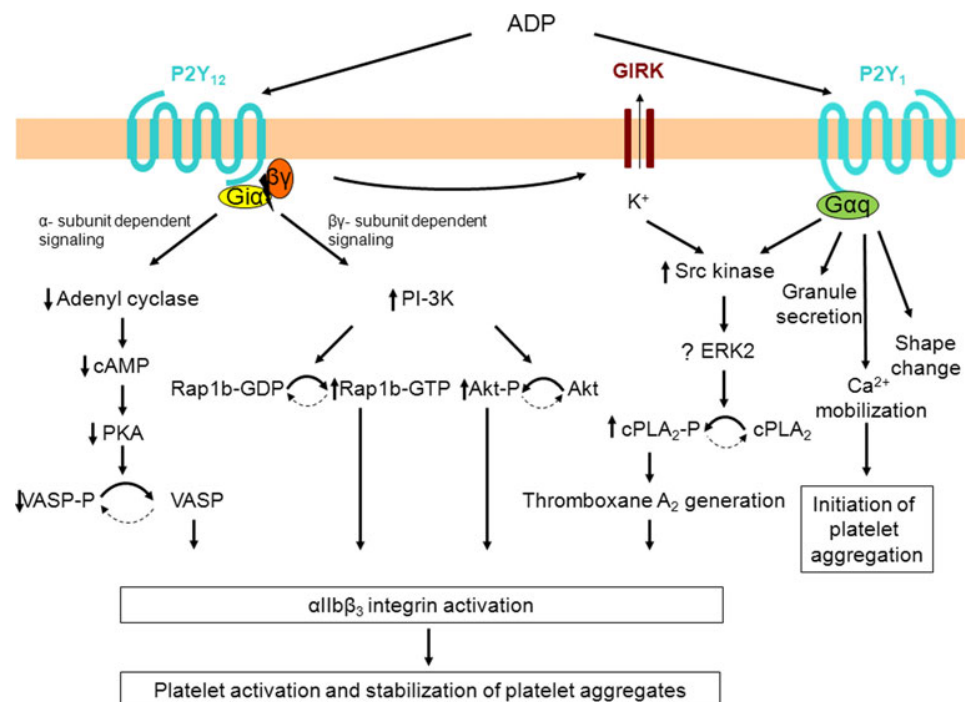
Il recettore è accoppiato ad una proteina GI costituita da due sub unità del tipo Gα12 e ad una Gβγ; contiene 7 regioni trans membrana idrofobiche connesse attraverso 3 loops intracellulari e 3 extracellulari. In totale sono presenti 342 amminoacidi nel recettore umano.



La sequenza amminoacidica contiene 10 residui di cisteina:

- quattro nel dominio extracellulare in posizione 17,97,175 e 270; queste formano due ponti disolfuro tra il dominio N-terminale e EL3, e tra EL1 e EL2,
- cinque in posizione 194, 208, 248, 292 e 302 localizzate nel dominio trans membrana
- una intracellulare in posizione 315.

L'importanza dei residui cisteinici è legata alla possibilità dei reagenti tiolici (es: Clopidogrel) di legarsi al recettore impedendone la risposta alla ADP.



Quando l'ADP si lega al recettore si ha dissociazione delle due sub unità con diverse vie di trasduzione:

1. G12 inibisce la produzione di Adenilato ciclasi (AC) che ha come effetto la diminuzione della concentrazione citosolica di cAMP.

A sua volta bassi livelli di cAMP inibiscono l'attivazione di PKA, presente a livello piastrinico sia nella forma I che IIb e responsabile della fosforilazione del VASP.

Il VASP defosforilato ha come effetto finale l'attivazione dell'integrina GPIIb/IIIa, che partecipa all'attivazione e alla stabilizzazione dell'aggregato piastrinico.

2. La sub unità $G\beta\gamma$ attiva IP3K che ha sempre come effetto finale l'attivazione della integrina GPIIb/IIIa, in questo caso però le vie di trasduzione interessate sono molteplici e alcune ancora da chiarire.

Diverse isoforme di IP3K sono espresse a livello delle piastrine le principali sono PI3K β (membro della classe delle isoforme Ia che consiste nelle sub unità catalitiche p110 β e p110 α regolate dalla tirosin chinasi) e PI3K γ (membro della classe delle isoforme Ib che consiste nella sub unità catalitica p110 γ , attivata da un recettore accoppiato a proteina G).

L'attività di entrambe le isoforme è fondamentale per sostenere la risposta aggregante.

L'attivazione dell'IP3K comporta ritardo nell'accumulo di PI3-4DP indotto dai PAR-1 e rapido e transiente accumulo di IP3-4-5TP che ha un ruolo fondamentale nel sostegno alla aggregazione piastrinica. (*Lova et al 2003*)

A seguito di questo processo hanno inizio tutta una serie di meccanismi pro-aggreganti quali:

- attivazione della GTPase Rap1b, localizzata nella membrana delle piastrine silenti e associata al citoscheletro tramite l'actina in seguito alla stimolazione piastrinica.

Il passaggio dalla forma attiva avviene in seguito al legame con GTP, e allo stimolo da parte della isoforma IP3K β ; l'effetto finale è sempre di sostegno all'aggregazione tramite attivazione dell'integrina GPIIb/IIIa .

- Attivazione e doppia fosforilazione di Akt, importante intermedio nel processo di attivazione dell'aggregazione. Akt, (detto anche PKB o RAC) appartiene alla famiglia delle serin/treonin chinasi intracellulari ed espresso in varie cellule, nelle piastrine in particolare troviamo Akt1 e Akt2.

La doppia fosforilazione di Akt ,(tramite PDK1 alla treonina 308 e PDK2 o auto fosforilazione alla serina 473) promuove il rilascio di ADP dai granuli densi piastrinici e ha come effetto finale l'incremento della risposta aggregativa integrina-GPIIb/IIIa -mediata e stabilizzazione del trombo.

- Attivazione della GIRKs (*G protein coupled inwardly rectifying K channel*) attraverso legame alla regione citosolica e successiva attivazione della via di trasduzione mediata dalla chinasi Src.

Sia GIRKs che Src in seguito alla stimolazione del recettore P2Y₁₂ potrebbero avere un ruolo nell'induzione del processo di fosforilazione della fosfolipasi A₂ citosolica quindi nella sintesi dei trombossano A₂ e pertanto nella promozione dell'aggregazione.

Il meccanismo di fosforilazione (a livello della serina 505) della cPLA₂ è dovuto ad una chinasi extracellulare del tipo ERK2(*extracellular signal-regulated kinase2*); ovvero ad un intermedio a valle della via di trasduzione della Src tirosin chinasi appartenente ad un sottogruppo delle MAPKs (*mitogen-activated protein Kinases*).

Questo ultimo processo non è ancora stato chiarito del tutto, si ritiene in ogni caso che non sia cruciale ai fini dell'attivazione dell'Integrina GPIIb/IIIa.

Anormalità congenite nel recettore P2Y₁₂:

Deficit congeniti del recettore P2Y₁₂ sono considerati disordini autosomici recessivi e sono stati identificati per la prima volta nel 1992. Il deficit di P2Y₁₂ può esser dovuto a:

- delezione di un nucleotide a livello della griglia di lettura
- mutazione che comporta una prematura troncatura della proteina
- sostituzione di un nucleotide nel codone di trasduzione iniziale

Disfunzioni congenite sono associate con problematiche molecolari legate ai sei domini trans membrana e ai loop extracellulari, la cui integrità è cruciale per la normale attività del recettore.

Gli eterozigoti possono mostrare un modesto difetto della funzione piastrinica simile a quella osservata nelle malattie da accumulo o sindrome da deficit primario di secrezione (PSD) in cui si ha normale accumulo nei granuli densi di TXA2 e ADP ma insufficiente liberazione.

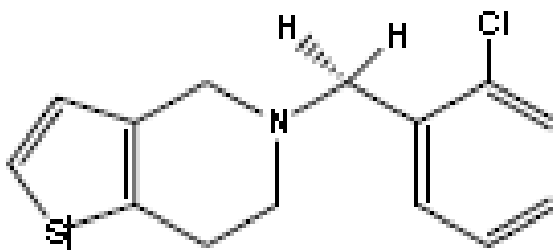
Gli omozigoti presentano una storia di eccessivo sanguinamento, allungamento del tempo di sanguinamento, aggregazione reversibile in presenza di un agonista debole e compromessa aggregazione in risposta a basse concentrazioni di collagene e trombina. L'elemento caratterizzante primario rimane in ogni caso l'insensibilità del recettore anche ad elevate concentrazioni di ADP(> di 10 μ M). Questo può esser valutato dall'aumento dei livelli di cAMP dopo stimolazione piastrinica con PGE1.

Studi hanno evidenziato una certa variabilità interindividuale per quanto riguarda la sintomatologia legata al tempo di sanguinamento (dai 15 ai 30 minuti), ed è stata riscontrata una certa variabilità anche nella tendenza al sanguinamento sia a livello delle mucose che in seguito ad operazioni chirurgiche, in alcuni casi legato all'età dell'individuo.(*Cattaneo et al 2011*)

Il trattamento della condizione clinica descritta consiste nell'emotrasfusione, quando l'emorragia è importante, anche se questo evento è raro.

IV.GLI INIBITORI IRREVERSIBILI DEL RECETTORE P2Y12

1. TICLOPIDINA(TIKLID®)



La Ticlopidina è un antiaggregante che, come l'ASA (Acido acetil salicilico), può vantare di un'adeguata documentazione clinica di efficacia.

La Ticlopidina è indicata nella prevenzione secondaria di eventi ischemici occlusivi cerebro e cardiovascolari in pazienti a rischio trombotico. In pazienti con pregresso infarto miocardico e con pregressi attacchi ischemici transitori l'uso della Ticlopidina, prima dell'introduzione dei nuovi inibitori del recettore P2Y12, era riservato a quei pazienti in cui l'acido acetilsalicilico risultava inefficace o non ben tollerato. Rimane comunque valida per il trattamento e la prevenzione della riocclusione dei by-pass aortocoronarici, nella circolazione extra-corporea, nella emodialisi e nella trombosi della vena centrale della retina.

❖ FARMACOCINETICA

la Ticlopidina non è attiva come tale e il suo metabolita attivo viene liberato solamente dopo metabolismo epatico, grazie al citocromo P450, prevalentemente l'isoenzima CYP3A4. Il metabolita attivo va ad agire sul recettore P2Y12 inibendolo in maniera selettiva ed irreversibile, rendendo così incapaci le piastrine di andar incontro ad aggregazione per la restante parte della loro vita. I metaboliti poi vengono escreti prevalentemente per via biliare (70%) e per via renale (30%).

Dal punto di vista farmacocinetico, dopo somministrazione di una dose unica di Ticlopidina per via orale (250 o 500 mg) la massima concentrazione plasmatica del principio attivo è raggiunta in 2 ore ed il farmaco viene quasi completamente eliminato dal torrente circolatorio 8 ore dopo la somministrazione.

Alle dosi terapeutiche l'inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta dalla Ticlopidina diviene significativa dopo 24-48 ore dall'inizio del trattamento; l'effetto massimo viene raggiunto in 4-7 giorni e scompare 7-10 giorni dopo la sospensione della terapia. Si è visto che con dosi superiori a 500 mg/die non si ha una maggiore attività antiaggregante.

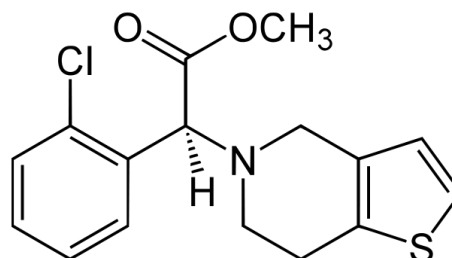
È noto fin dalla prima commercializzazione del medicinale in Europa nel 1978, che la terapia con Ticlopidina è frequentemente gravata dal verificarsi di reazioni avverse di tipo ematologico: sono stati descritti casi di anemia aplastica, agranulocitosi, pancitopenia, ma soprattutto questo antiaggregante può provocare neutropenia, un evento che può essere anche letale in quanto si associa ad un aumentato rischio di gravi infezioni. La neutropenia di solito si manifesta nei mesi iniziali della terapia, mentre è infrequente nelle prime due - tre settimane di trattamento, generalmente è reversibile e si risolve interrompendo la somministrazione del farmaco.

Un altro grave evento indesiderato della Ticlopidina, talora letale, è la porpora trombotica trombocitopenica (PTT) una sindrome caratterizzata da trombocitopenia, anemia emolitica, modificazioni neurologiche, insufficienza renale progressiva e febbre.

Dati questi eventi ematologici potenzialmente gravi, si consiglia di riservare la Ticlopidina alla prevenzione della riocclusione di stent coronarici, valutandone il rischio-beneficio, e ai casi in cui l'ASA risulti realmente controindicato, a causa della comparsa di questi effetti avversi gravi, l'impiego di questo medicinale è stato progressivamente limitato nel tempo in numerosi Paesi.

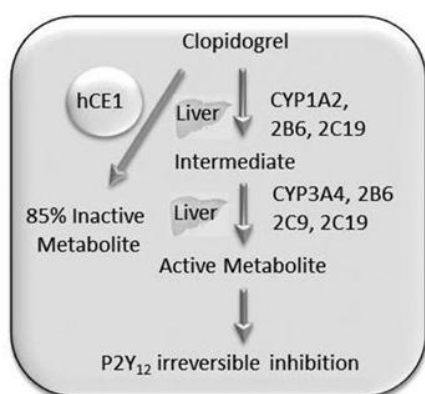
Ad oggi l'utilizzo della Ticlopidina è più limitato, grazie alla commercializzazione dei nuovi antiaggreganti con stesso target d'azione; in particolare l'uso di Clopidogrel ha quasi del tutto soppiantato la Ticlopidina.

2. CLOPIDOGREL (Plavix®)



Clopidogrel è una Tieno tetraidropiridina di seconda generazione ed agisce con lo stesso meccanismo della Ticlopidina; esso differisce da quest'ultima solamente per la presenza di un gruppo carbossimetilico. E' un farmaco relativamente recente, la sua prima Autorizzazione all'Immissione in Commercio (AIC) è stata nel 1997 negli USA e nel 1998 in Europa. Clopidogrel è indicato nella prevenzione di eventi di origine aterotrombotica in pazienti affetti da infarto al miocardio, ictus ischemico o arteriopatia, pazienti affetti da sindrome coronarica: angina instabile, pazienti sottoposti a posizionamento di stent in seguito a intervento coronarico percutaneo, in associazione con acido acetilsalicilico (ASA).

❖ FARMACOCINETICA



Il Clopidogrel, come la Ticlopidina è inattivo in vitro è infatti un pro-farmaco che necessita di una bioattivazione per raggiungere la sua efficacia nell'inibizione dell'aggregazione piastrinica.

Circa il 50% del pro-farmaco è assorbito, di questo l'85% è idrolizzato dalle esterasi in una forma inattiva mentre solo il restante 15%

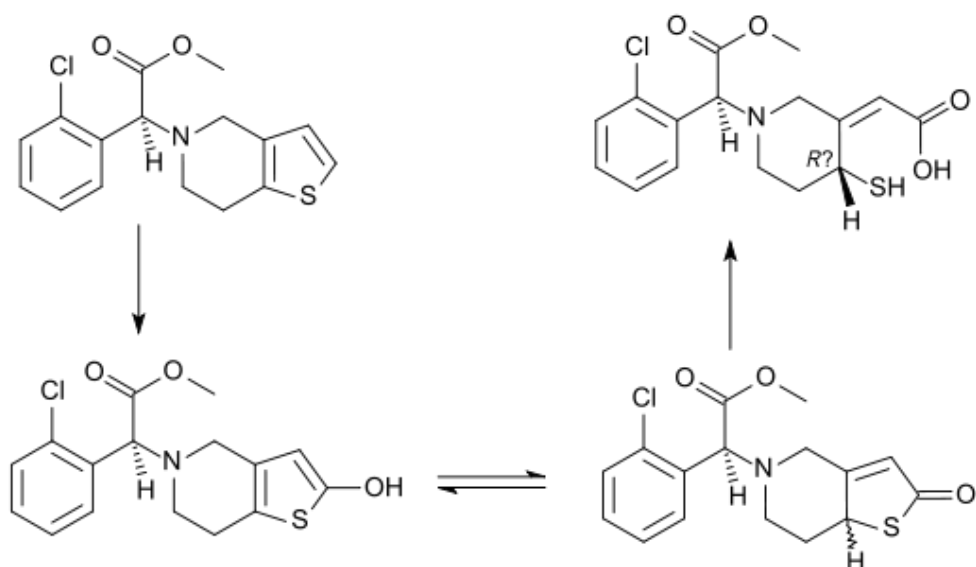
rimane disponibile per la trasformazione in agente attivo.

A livello del fegato avviene la trasformazione in metabolita attivo attraverso due processi metabolici:

- Inizialmente il 15% del pro farmaco viene trasformato in un metabolita, sempre inattivo, 2-oxoclopidogrel da tre enzimi (cyp450 [CYP]1A 2 ,CYP2B6 e CYP2C19)
- Il 2-oxoclopidogrel è in fine metabolizzato da quattro enzimi: (CYP2B6, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4) nella sua forma attiva

Il CYP2C19 è coinvolto in entrambe le fasi metaboliche e contribuisce a circa il 45% della formazione del 2-oxoclopidogrel e ad un 21% alla generazione del metabolita attivo.

Si vedrà in seguito come polimorfismi genetici a carico di questo enzima possano influenzare la risposta al trattamento con Clopidogrel.



Il metabolita attivo del Clopidogrel è stato identificato come un tiolo derivato che inibisce il recettore P2Y₁₂ attraverso la formazione di ponti disolfuro con la Cys97 e la Cys175 del recettore.

Il legame di un potente agonista come il P-2MeS-ADP alle piastrine è fortemente inibito dal metabolita attivo del Clopidogrel in maniera dose-dipendente con una IC₅₀ di 1,8μM.

La $t_{1/2}$, in seguito ad una dose di 75mg è circa di 6h, poiché il legame al recettore è irreversibile questo parametro non rappresenta la durata dell'azione inibitoria sulle piastrine (IPA).

I metaboliti sono principalmente eliminati per via urinaria (60%) e in parte per via fecale (23%).

In seguito a somministrazione di una dose di carico di 300mg di Clopidogrel, sono necessarie circa 2-4 h per avere IPA (*inhibition of platelet aggregation*).

Si può notare come la farmacocinetica del Clopidogrel sia significativamente dose dipendente infatti in seguito ad una dose di carico di 600 mg si ha una riduzione del 51% della biodisponibilità rispetto a una dose di 75mg/die di mantenimento; questo indica come la quota di metabolita attivo sia non proporzionale al di sopra del *range* di 75-600 mg. Si ritiene che la formazione del metabolita attivo sia limitata dall'assorbimento gastrico del Clopidogrel.

A livello gastrico l'assorbimento è regolato dalla pompa di efflusso intestinale P-glycoproteina (P-gp); anche qui mutazioni genetiche possono alterare la biodisponibilità orale del Clopidogrel.

❖ STUDI CLINICI:

La definizione di “Resistenza” al Clopidogrel:

Un Argomento centrale è quanto sia appropriato impiegare per la definizione di resistenza al Clopidogrel parametri raccolti durante il trattamento quali, prolungata aggregazione piastrinica e il ripresentarsi di fenomeni trombotici.

Da un punto di vista teorico quando si parla di resistenza all'effetto di un agente questo deve essere quantificato, ciò necessita l'impiego di modelli di aggregazione *in vitro* in modo da identificare chiaramente i cambiamenti indotti dal farmaco.

Inoltre, sempre teoricamente, la “ resistenza “ implica una risposta alterata statisticamente provata (per esempio, cambiamenti nell'aggregazione piastrinica con più di due deviazioni standard sotto la media della popolazione normale); pertanto si dovrebbe evitare di definire resistenza qualsiasi fallimento nell'ottenimento di uno specifico target terapeutico. *.(Bonello et al. 2010)*

La combinazione tra la proliferazione di studi che valutano l'aggregazione durante il trattamento e la necessità di imporre un target per la residua risposta aggregativa

all'ADP, ha portato all'utilizzo sempre più frequente negli studi clinici di “high on-treatment aggregation” come sostituto di “resistenza” al Clopidogrel.

La resistenza al Clopidogrel è definita quindi dalla differenza tra la responsività all'ADP prima del trattamento e dopo, ovvero come una algebrica conseguenza dell'attivazione piastrinica in presenza o meno dell'effetto del Clopidogrel. Questo parametro difficilmente riesce a considerare la possibile presenza di HPR pre-trattamento; infatti i valori di PRI ricavati dalla tecnica del VASP® sono indipendenti dalla iper aggregabilità piastrinica pre trattamento e valori di PRI < 50% non sono in grado di fornire informazioni sull'integrità della via di trasduzione di prostanoïdi

Rimane quindi incerta la relazione effettiva tra queste misure e la “resistenza” al Clopidogrel.(*Cattaneo et al. 2013*)

L'efficacia clinica di Clopidogrel è generalmente valutata a partire dal suo effetto antiaggregante. Trombosi da stent sono spesso ricorrenti in individui in cui l'effetto del Clopidogrel è limitato.

La “Resistenza al Clopidogrel” è in teoria causata da una diminuzione della concentrazione del metabolita attivo nel sangue e/o a modificazioni biochimiche intracellulari post-recettoriali.

Possiamo pertanto definire la “resistenza al Clopidogrel ” come dovuta ad una combinazione di meccanismi farmacogenetici, farmacocinetici e biochimici intracellulari.(*Bonello et al. 2010*)

Considerevole attenzione negli ultimi anni è stata indirizzata nel provare che la trombosi da stent avviene più facilmente in pazienti con una mutazione a livello del CYP2C19 (implicato nella bioattivazione del Clopidogrel). Inoltre altri studi sono stati compiuti per valutare le interazioni con altri farmaci che, seppur marginalmente, potrebbero limitare l'efficacia del trattamento con Clopidogrel.(*Ferri et al 2013*)

Dati sulla popolazione suggeriscono inoltre che la “resistenza” al Clopidogrel si presenti maggiormente in pazienti con SCA piuttosto che in soggetti normali e che tale “resistenza” sia abbastanza comune in pazienti obesi o diabetici.

Se gli aspetti legati alla sfera pre-recettoriale sono stati ormai buona parte caratterizzati, rimangono ancora da chiarire quelli legati al danneggiamento delle vie

di segnale intracellulari che si susseguono in seguito alla inibizione del recettore P2Y₁₂(post-recettoriali).

In questi casi il fenomeno della resistenza potrebbe presentarsi perfino in altri inibitori del recettore P2Y₁₂, indipendentemente dalla via di attivazione.

La delineazione di queste componenti non genetiche di resistenza potrebbe facilitare lo sviluppo di terapie ottimali per pazienti ad elevato rischio cardiovascolare.

(Cattaneo et al. 2013)

La Variabilità della Risposta

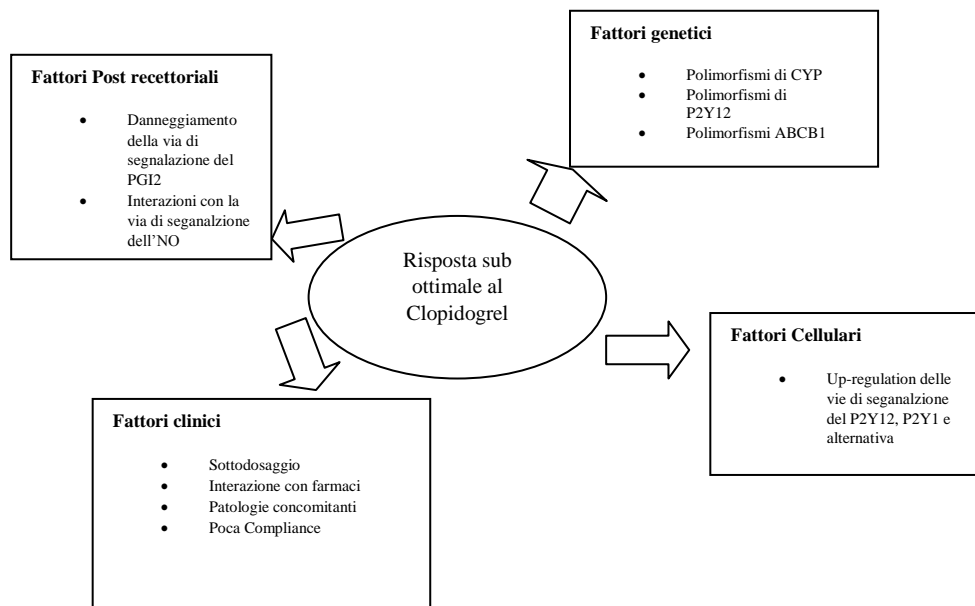
Come illustrato in figura sono diversi i fattori che concorrono realmente o teoricamente all'alterazione della risposta alla terapia con Clopidogrel. In particolare questi sono raggruppati in :

1. Fattori pre-recettoriali che comprendono:

- Fattori genetici
- Fattori cellulari

2. Fattori post-recettoriali

3. Fattori clinici



1.I FATTORI PRE-RECETTORIALI:

FATTORI GENETICI:

Genotipo del CYP2C19:

Partendo dal presupposto che il Clopidogrel è un pro-farmaco, individui sani e pazienti che presentano una mutazione a carico del CYP2C19 (il maggior responsabile del processo di attivazione del Clopidogrel) hanno una concentrazione di metabolita attivo minore in circolazione e pertanto minore inibizione piastrinica.

Attraverso il VASP test è infatti osservabile che soggetti sani con una mutazione a carico del CYP2C19 hanno un PRI maggiore rispetto a quelli che non presentano questa mutazione.

Se la mutazione interessa pazienti sottoposti a PCI, questi hanno un rischio molto più elevato di sviluppare trombosi da stent se paragonati con pazienti nelle stesse condizioni ma privi di tale mutazione.

L' impatto di questa mutazione è pertanto rilevante ed infatti nel 2010 la FDA ha elaborato un "*Black Box warning*" in cui si informava medici e pazienti del rischio di fallimento terapeutico in quegli individui definiti scarsi metabolizzatori.

Ad oggi sono due le principali mutazioni note che affliggono in maniera negativa il metabolismo di attivazione: CYP2C19*2 e CYP2C19*3

Come molte altre superfamiglie di CYP il gene codificante per il CYP2C19 è altamente polimorfico, con più di 25 varietà di alleli note.

La più comune è la CYP2C19*2 con una frequenza di circa il 15% nelle popolazioni Caucasiche ed Africane e del 29-35% in quelle Asiatiche.

Uno studio condotto su 145 pazienti cinesi con CAD in seguito a PCI ha individuato tre fenotipi metabolizzatori: gli estensivi (39,3% dei pazienti analizzati), gli intermedi (47,5%) e gli scarsi metabolizzatori (13,1%; nell'ultimo gruppo circa il 36,8% era resistente al Clopidogrel). (Varenhorst C et al 2013)

Lo studio ha confermato una tendenza marcata al presentarsi di eventi cardiovascolari in portatori del genotipo *2.

Sempre nello stesso studio è stata evidenziata una certa frequenza della mutazione *3 (il 9% era portatore di questa mutazione, il 53,8% del genotipo *2) anche questa complice di una alterata metabolizzazione del Clopidogrel e pertanto di una ridotta funzionalità antiplastrinica.

Se tuttavia lo studio ha evidenziato una connessione tra genotipo *2 e HPR questo non è stato del tutto confermato per il genotipo*3.

In contrasto con quello fin ora analizzato risulta invece la mutazione CYP2C19*17 in cui si riscontrata una “ultrametabolizzazione” del Clopidogrel con un PRI minore se comparato con il genotipo normale ma accompagnata da un maggiore rischio di sanguinamento. (Varenhorst C et al 2013)

Da questi studi si può evincere che la popolazione che più risente di questo tipo di mutazione è quella in cui la terapia da Clopidogrel è prescritta in seguito a PCI, per quanto riguarda le altre applicazioni del farmaco non sembra ci siano gli stessi riscontri.

Pertanto, la popolazione per cui Clopidogrel apporta un maggiore beneficio è anche quella in cui il genotipo dei CYP2C19 è più rilevante.

Sebbene il genotipo del CYP2C19 sia una delle maggiori determinanti della risposta farmacocinetica e farmacodinamica al Clopidogrel, questo è in grado di spiegare solo il 12% della variabilità d'azione del Farmaco.

Sono state identificate altre varianti del CYP2C19 la *3 e la *8. Tuttavia, la bassa frequenza di queste mutazioni (<1%) sottolinea un impatto minore sull'HPR.

Study (Ref. #)	Polymorphism	N	Population	Follow-Up	Outcome
Sibbing et al.	2C19*17	1,524	PCI	30 days	TIMI major bleeding
Campo et al.	2C19*17	300	PCI	1 year	TIMI major bleeding
Harmsze et al.	2C19*17	820	Elective PCI	1 year	TIMI major bleeding
Jeong et al.	2C19*17	266	MI	1 year	TIMI major bleeding
CURE and ACTIVE	2C19*17	5,059	ACS or AF	1 year	Major bleeding
CHARISMA	2C19*17	4,819	CAD or at high risk	2 years	GUSTO severe bleeding
PEGASUS-PCI	2C19*17	416	PCI	1 year	TIMI major bleeding

Study (Ref. #)	Polymorphism	N	Population	Follow-Up	Outcome
AFILI	2C19*2	371	MI (at <45 years of age)	6 years	MACE
TRITON TIMI-38	2C19*2	1,477	PCI+ACS	15 months	MACE
Oh et al.	2C19*2	2,146	PCI+DES	1 year	MACE
Shuldiner et al.	2C19*2	227	Elective PCI	1 year	MACE
RECLOSE	2C19*2	772	PCI	6 months	ST
Harmsze et al.	2C19*2	176/420	PCI (ST case/control)	1 year	ST
Sibbing et al.	2C19*2	2,485	PCI	30 days	ST
ONASSIST	2C19*2	123/246	PCI (ST case/control)		ST
Harmsze et al.	2C19*2	725	Elective PCI	1 year	MACE
Campo et al.	2C19*2	300	PCI	1 year	MACE
CHARISMA	2C19*2	4,819	CAD or at high risk	2 years	MACE
Tiroch et al.	2C19*2	928	MI	1 year	MACE
Sawada et al.	2C19*2	100	PCI+DES	8 months	MACE
PEGASUS-PCI	2C19*2	416	PCI	1 year	ST
Jeong et al.	2C19*2 and *3	266	MI	1 year	MACE

Studi in cui è stata analizzata l'associazione tra 2C19*2/3/17 e il verificarsi di eventi ischemici
(J Am Coll Cardiol Interv 2013.)

Diversi studi hanno dimostrato che i livelli di inibizione piastrinica indotta dal Clopidogrel in pazienti con genotipo 2C19 alterato possono essere migliorati attraverso l'aggiunta di Elinogrel, Cilostazolo o un antagonista del GP-IIb/IIIa.

Nei casi di resistenza al Clopidogrel dovuti a mutazioni CYP2C19*2 neanche una dose di carico di 900mg è in grado di superare HPR.

Interessantemente nello studio ACCELAMI2C19 (Adjunctive Cilostazol Versus High Maintenance-Dose Clopidogrel in Acute Myocardial Infarction [AMI] Patients According to CYP2C19 Polymorphism) l'aggiunta di Cilostazolo se comparata con un'alta dose di mantenimento di Clopidogrel riduce in maniera più efficace la quota di HPR in pazienti con storia pregressa di MI.

Essendo un inibitore della PDEIII, cilostazolo agisce su un *pathway* diverso dal Clopidogrel.

Il Cilostazolo inibisce l'attività della PDE, sopprimendo la degradazione della cAMP e attivando il VASP; pertanto ne risulta che il Cilostazolo interviene sulla stessa via di trasmissione del Clopidogrel senza però agire sul recettore P2Y12.

Questo aspetto può spiegare in parte la superiorità della sua aggiunta rispetto ad una elevata dose di mantenimento di Clopidogrel.

(Lee, et al 2013.)

Genotipo dell' ABCB1:

La resistenza al Clopidogrel potrebbe esser dovuta anche ad uno scorretto assorbimento gastro-intestinale.

Il gene ABCB1 (in passato noto come Pg-licoproteina o CD243) appartiene alla sub-famiglia B1 che codifica per una pompa ad efflusso ATP-dipendente coinvolta nell'assorbimento di molti farmaci a livello dell'epitelio intestinale.

Pazienti in terapia con Clopidogrel e portatori del genotipo ABCB1 TT e CT negli studi condotti hanno dimostrato *outcomes* peggiori (morte, MI acuto) se comparati con portatori dell'allele ABCB1 CC.

Se quest'ultima mutazione è combinata con CYP2C19*2 e *3 il tasso di eventi negativi risulta cinque volte maggiore in confronto con la sola mutazione del ABCB1. (Varenhorst C et al 2013)

TRITON TIMI-38	ABCB1	2,932	ACS+PCI	15 months	MACE
FAST-MI	ABCB1	2,208	PCI+MI	1 year	MACE
ONASSIST	ABCB1	123/246	PCI (ST case/control)		ST
Campo et al.	ABCB1	300	PCI	1 year	MACE
PLATO	ABCB1	10,285	ACS	1 year	MACE
Harmsze et al.	ABCB1	176/420	PCI (ST case/control)	1 year	ST
Jeong et al.	ABCB1	266	MI	1 year	MACE
Tiroch et al.	ABCB1	928	MI	12 months	MACE

*Studi in cui è stata analizzata l'associazione tra mutazioni ABCB1 e verificarsi di eventi ischemici
(J Am Coll Cardiol Intv 2013.)*

Polimorfismi del recettore P2Y12:

Come già analizzato in precedenza una determinante della resistenza al Clopidogrel potrebbe essere il polimorfismo associato al recettore P2Y12.

Il gene che codifica il recettore è formato da due esoni separati da un introne. Nella sequenza del gene sono stati localizzati cinque polimorfismi. I polimorfismi consistono di quattro diverse sostituzioni di un singolo nucleotide (SNPs) e di un'inserzione mononucleotidica. I polimorfismi i-C139T, i-T744C, i-ins801A e G52T sono in completo *linkage disequilibrium*, cioè in associazione

statistica tra specifici alleli relativi a due o più loci, nella popolazione caucasica. In questo modo è possibile discriminare due aplotipi diversi, l'aplotipo H1 e l'aplotipo H2. L'aplotipo H1 rappresenta l'aplotipo maggiore con una frequenza nella popolazione dell'86%, H2 risulta dunque essere l'aplotipo minore e si presenta con una frequenza del 14%. L'aplotipo H2 è stato associato ad una massima aggregazione piastrina in risposta all'ADP.

Una spiegazione valida per questa differenza di aggregazione piastrinica in soggetti portatori dell'allele H2 porta alla formulazione dell'ipotesi che vi sia un aumento del numero di recettori P2Y₁₂ sulla superficie piastrinica, con una conseguente maggior risposta all'ADP. L'aplotipo H2 può essere associato ad una variazione nella sequenza promotrice; questa variazione determina un aumento nell'efficienza di trascrizione. Il fatto che sia stato evidenziato che un aplotipo di questo recettore è fortemente associato con un aumento consistente dell'aggregazione piastrinica in risposta all'ADP, comporta che vi sia un aumento del rischio di problemi di aterotrombosi per i soggetti portatori dell'aplotipo in questione e un'attenta rivalutazione del dosaggio della terapia con Clopidogrel. (*Patel, et al 2013*)

2.FATTORI CELLULARI:

- **Up-regulation di vie di segnalazione P2Y- indipendenti:**

Come abbiamo già discusso le piastrine possono essere attivate da altre vie di segnalazione indipendenti dall'ATP:

- Ipersensibilità a collagene e trombina. La stimolazione dell'integrina GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$) e della glicoproteina GPVI da parte del collagene e dei recettori PAR1/PAR4 da parte della trombina portano all'attivazione delle piastrine. Un aumento della sensibilità ad uno solo di questi mediatori può attivare la piastrina nonostante la terapia con Clopidogrel. (*Kuliczowski et al. 2010*)

- La presenza di monociti/macrofagi può indurre l'aggregazione piastrinica quando esprimono la COX-2, forma inducibile della COX. La COX-2 può essere sempre in grado di produrre i precursori del TxA2, convertiti poi in TxA2 dalle piastrine e dagli stessi monociti/macrofagi.
- Interazioni con gli elementi del sangue intero. Gli eritrociti facilitano l'aggregazione piastrinica intensificando la sintesi di TxA2, aumentando l'attività della fosfolipasi A2 in modo da permettere l'accumulo di acido arachidonico e inducendo la degranolazione piastrinica.

3.FATTORI CLINICI:

Obesità e Sindrome Metabolica

La variabilità di risposta al Clopidogrel è stata associata in molti studi al BMI (body mass index) dei pazienti in terapia, identificando negli obesi (BMI>30) una minore responsività e una minore tendenza al sanguinamento

Un recente studio ha cercato di correlare l'impatto non solo dell'obesità ma anche della sindrome metabolica (SM) specialmente in pazienti sottoposti a PCI e in terapia con Clopidogrel.

Studi hanno evidenziato che la SM è associata a diversi fattori di rischio cardiovascolare quali: ipercoagulabilità, ipofibrinolisi e iperattività piastrinica. (*Alessi et al 2008*)

Specialmente quest'ultimo fattore di rischio è responsabile della resistenza al Clopidogrel.

Le cause della iperattività piastrinica sono state correlate con resistenza all'insulina, iperlipidemia, infiammazione ed incremento dei livelli citosolici di Ca⁺⁺ e dello stress ossidativo.

In uno studio (*Saskia et al. 2013*) volto ad analizzare l'efficacia terapeutica del Clopidogrel sono stati presi in considerazione 1,542 pazienti, obesi

(IBM>30) e non obesi (IBM<30) affetti da SCA e trattati con Clopidogrel a diversi dosaggi(75 mg, 150 mg)

La tecnica diagnostica impiegata è stata quella del VASP e HPR è stata identificata con valori di PRI > 50%.

Il gruppo degli obesi è stato inoltre classificato in due categorie:

- obesi senza SM
- obesi con SM

In base alla presenza di almeno 3 dei 5 criteri:

- circonferenza del bacino (>102 cm uomini , and >88 cm donne)
- Glicemia a digiuno: oltre 100 mg/dl
- Iperensione arteriosa: oltre i 130/85 mm Hg
- Ipertrigliceremia: oltre i 150 mg/dl;
- Ridotto colesterolo HDL: 40 mg/dl nei maschi, 50 mg/dl nelle femmine

Sono state valutate le seguenti casistiche:

- Risposta tramite parametri PRI-VASP in obesi vs non obesi nelle diverse classi
- Incidenza di HPR (PRI>50%) in obesi vs non obesi
- Incidenza di sanguinamento in obesi vs non obesi

Lo studio ha fatto emergere un aspetto molto interessante, ha evidenziato che tra i pazienti obesi senza MS , per qualsiasi dose di Clopidogrel somministrata, e quelli non obesi non c'erano in realtà sostanziali differenze di HPR, e che la MS, in molte analisi, era in grado di predire l'HPR più accuratamente dell'obesità.

È stata infine confermata una maggiore tendenza al sanguinamento nel gruppo di non obesi, probabilmente dovuta al fatto che in quest'ultimo gruppo il numero degli iper responsivi era maggiore.

In conclusione un parametro ancora più rappresentativo dell'obesità nel predire o meno l'efficacia di un trattamento con Clopidogrel è la MS, poiché una ipo responsività fa sì che risulti necessaria una terapia su misura, più aggressiva, basata sullo status metabolico del paziente piuttosto che sul solo BMI.

Diabete

Pazienti con diabete e ACS, oltre ad essere maggiormente esposti ad altri eventi avversi cardiovascolari, sono più soggetti ad avere una risposta inadeguata al Clopidogrel.

L'insieme delle evidenze cliniche suggeriscono che in questi pazienti la resistenza al Clopidogrel sia dovuta ad una iper aggregabilità piastrinica a priori causata dalla resistenza insulinica piuttosto che da insufficiente concentrazione di metabolita attivo o a problematiche nel *pathway* del P2Y12

Di particolare interesse è il diabete mellito di tipo 2 che è associato con uno stato pro infiammatorio e pro trombotico, infatti l'insulina presenta un ruolo nel controllo dell'aggregazione piastrinica, intervenendo sui livelli intracellulari di cGMP e NO. (*Trovati et al 2002.*)

In più, in uno studio del 2012 condotto dall'Università di Roma, è stato scoperto che nei soggetti diabetici sussiste una iperproduzione di isoprostano, un particolare eicosanoide derivato dalla reazione dell'AA con ROS, responsabile della propagazione dell'attivazione piastrinica e dell'amplificazione della risposta GbIIb/IIIa-mediata.

Lo studio ha dimostrato che nei pazienti diabetici vs non diabetici il fallimento di una terapia antiaggregante era più probabile in virtù di una HPR isoprostano mediata.

Nello studio OPTIMUS è stato evidenziato che una dose di 75mg/die di Clopidogrel+ASA in pazienti affetti da diabete mellito 2 e SCA è insufficiente a garantire una copertura terapeutica; in particolare si è osservato che L'ASA è responsabile addirittura di un aumento dei livelli di

isoprostano probabilmente dovuti all'indirizzamento dell'AA , in seguito a blocco della COX1, verso la via metabolica ossidativa ROS-mediata.

Altri studi condotti su Sub-gruppi di analisi nei due maggiori trial di fase III TRITON-TIMI38 e PLATO hanno evidenziato la superiorità di Prasugrel vs Clopidogrel anche nel caso di alti dosaggi di Clopidogrel e un maggiore beneficio netto nella terapia con Prasugrel in pazienti con diabete mellito piuttosto che in pazienti non diabetici.(*Kim et al 2009*)

In questa classe di Pazienti la terapia più indicata rimane pertanto quella a base di Prasugrel o Ticagrelor, piuttosto che una doppia terapia con ASA+ Clopidogrel o quest'ultimo da solo.

Patologie Renali Croniche

Pazienti con ridotta funzionalità renale sono noti per avere una prognosi più nefasta per quanto riguarda le ACS, e in incremento nel rischio di trombosi e sanguinamento. Perfino una disfunzione renale leggera o moderata possono causare un aumento nel rischio di MI.

A livello di terapia antiaggregante le problematiche della terapia con Clopidogrel sono essenzialmente due:

- alterazioni associate a difetti a livello della clearance renale del farmaco che può comportare un aumento del rischio di sanguinamento dovuto ad una maggiore esposizione al metabolita attivo
- problemi di attivazione del pro farmaco come osservato nello studio CREDO (Clopidogrel for Reduction of Events During Observation) in cui la somministrazione di Clopidogrel riduceva il rischio di eventi avversi come MI o morte in pazienti con normale funzionalità renale ma evidenziava un trend opposto in pazienti con una disfunzione renale moderata o leggera.

Pertanto in questa classe particolare di individui è raccomandata una terapia a base di Prasugrel, il quale presenta IPA più o meno simili se confrontati con quelli su individui sani. (*Hurst et al 2013*)

In particolare una dose di 60 mg di Prasugrel sembra non subire alterazioni nel metabolismo e la quota di farmaco attiva risulta comunque efficiente nel compiere una massima azione farmacodinamica e clinica.

Interazioni tra Farmaci (DDIs):

Una ricerca online attraverso un database specifico per le DDIs ha rilevato 227 possibili farmaci capaci di dare interazioni con il Clopidogrel anche se la maggior parte di questi sono stati solo ipotizzati perché basati su similarità nella via di attivazione ma non clinicamente dimostrati.

Farmaci Inibitori di Pompa Protonica (PPIs)

In questi ultimi anni ha suscitato particolare interesse e clamore la possibilità un'interazione negativa tra i PPIs (inibitori di pompa protonica) e il Clopidogrel. (*Hokimoto et al. 2013*)

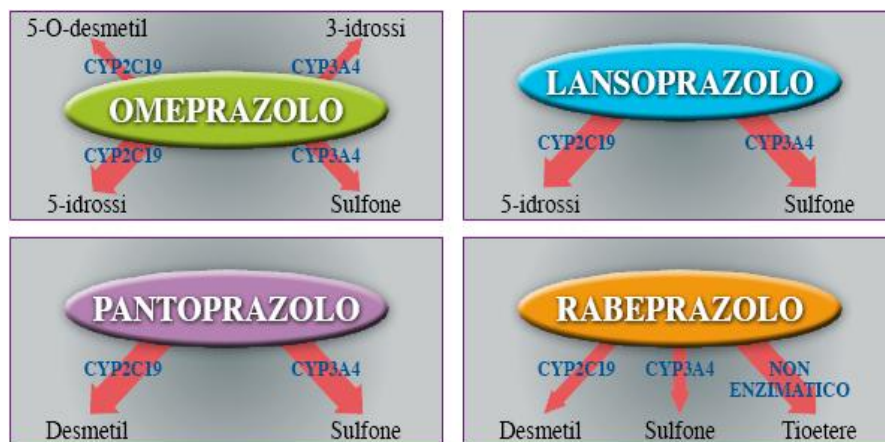
I farmaci inibitori di pompa protonica disponibili per l'uso clinico comprendono omeprazolo, lansoprazolo, pantoprazolo, rabeprazolo ed esomeprazolo. A causa del loro potente effetto inibitore sulla secrezione gastrica acida, i PPI sono utilizzati per il trattamento di varie condizioni patologiche nelle quali l'acidità gastrica concorre alla patogenesi di sintomi e/o lesioni organiche a carico del sistema digerente prossimale.

I PPI vengono metabolizzati nel fegato soprattutto a opera dei citocromi CYP2C19 e CYP3A4. In particolare:

- Omeprazolo è metabolizzato prevalentemente da CYP2C19 e mostra un basso grado di affinità per CYP3A4.

- Lansoprazolo è metabolizzato da CYP2C19 e CYP3A4, e anche in questo caso l'isoforma CYP2C19 sembra svolgere un ruolo predominante.
- Pantoprazolo è metabolizzato da CYP2C19 e CYP3A4 e la maggior parte dei suoi metaboliti subisce un processo di coniugazione con gruppi solfato.
- Rabeprazolo è convertito nel fegato principalmente a tioetere attraverso una reazione non enzimatica ed è scarsamente metabolizzato da CYP2C19 e CYP3A4.

Omeprazolo inibisce le isoforme CYP2C9 e CYP2C19 e può quindi interferire con il metabolismo epatico di alcuni farmaci. L'azione inibitrice su CYP2C19 è condivisa da esomeprazolo e lansoprazolo, ma non da pantoprazolo.



Rappresentazione schematica dei Cyp- coinvolti nel metabolismo dei PPIs

Studi a favore dell'interazione:

Gilard *et al* 2008. sono stati i primi a evidenziare un'interazione farmacologica tra clopidogrel e PPI nello studio OCLA (*Omeprazole CLopidogrel Aspirin*) sulla base dei dati raccolti sono state proposte due

ipotesi per spiegare le basi biologiche che sottendono la possibile interazione tra PPI e clopidogrel.

In primo luogo si ritiene che l'azione antiaggregante di Clopidogrel dipenda da un meccanismo di inibizione competitiva del citocromo CYP2C19 da parte dei PPI. Infatti, come visto, Clopidogrel è un pro farmaco attivato nel fegato grazie agli enzimi del citocromo P450. Un ruolo chiave è svolto dal CYP2C19, il quale, oltre a essere coinvolto nella bioattivazione di clopidogrel, è necessario anche per la metabolizzazione dei PPI. Su tali basi è stato ipotizzato che l'inibizione di CYP2C19 ad opera di alcuni PPI potrebbe causare una riduzione della capacità del fegato di attivare clopidogrel, con conseguente riduzione delle concentrazioni circolanti del suo metabolita attivo e perdita del suo effetto antiaggregante.

La seconda ipotesi chiama in causa la possibile influenza delle mutazioni (polimorfismi) dei geni che codificano per gli enzimi epatici coinvolti nel metabolismo dei PPI e di clopidogrel. Infatti, come sopra menzionato, il sistema del citocromo P450 svolge un ruolo determinante nella biotrasformazione dei PPI (inattivazione) e di clopidogrel(attivazione). Pertanto, alcuni PPI, inibendo l'attività enzimatica di CYP2C19, precipiterebbero gli individui non mutati da uno stato di "metabolizzatore rapido" a una condizione di "metabolizzatore lento", che è praticamente identica alla situazione nella quale si trovano i soggetti con mutazioni inattivanti di CYP2C19, i quali, come discusso in precedenza, hanno un rischio più elevato di sviluppare eventi avversi cardiovascolari a causa della loro scarsa capacità di convertire clopidogrel nel suo metabolita attivo.

In seguito all'allarme provocato dalla pubblicazione di questi studi, il 26 gennaio 2009 la *Food and Drug Administration* (FDA) americana aveva creato una nota informativa per avvertire i medici di una possibile interazione negativa, sempre nello stesso anno anche l'EMA si era adeguata.

Autori	Popolazione	Esposizione	Durata	Risultati
Gilard et al., 2008	124	DAT+ omeprazolo	7 giorni	PRI (7° giorno) del gruppo trattato 51,4% vs placebo:39,8%. L'omeprazolo diminuisce l'effetto antiaggregante piastrinico del clopidogrel, come dimostrato dal VASP
Ho et al., 2009	8205	Clopidogrel + PPI (omeprazolo, rabeprazolo, lansoprazolo, rabeprazolo)	Media di 521 Giorni	L'uso concomitante di clopidogrel e PPI aumenta il rischio di morte o SCA
Juurlink et al., 2009	13636	Clopidogrel + PPI (omeprazolo, rabeprazolo, lansoprazolo, rabeprazolo)	90 giorni	Maggior rischio di reinfarto nei pazienti in co-terapia, a eccezione del pantoprazolo

Studi che negano l'interazione:

Più recentemente altri studi hanno portato ad avvalorare l'ipotesi che l'interazione tra PPIs e Clopidogrel non sia effettivamente rilevante.

In seguito ai nuovi studi la FDA ha nel 2010 ritirato la nota informativa precedentemente promulgata.

O'Donoghue *et al.* 2009 hanno condotto un'analisi *post hoc* sui dati di due trial, il PRINCIPLE-TIMI 44 (*Prasugrel in comparison to clopidogrel for inhibition of platelet activation and aggregation*) e il TRITON-TIMI 38 (*Trial to assess improvement in therapeutic outcomes by optimizing platelet inhibition with prasugrel*) per stabilire l'associazione tra uso di PPIs, misure di funzionalità piastrinica e *outcome* clinici.

Dagli studi non è emerso come in precedenza una minore inibizione piastrinica in seguito a terapia concomitante.

O'Donoghue et al., 2009	PRINCIPLE-TIMI 44 N=201; TRITON-TIMI 38 N=13608	Prasugrel o clopidogrel ad alte dosi + PPI	PRINCIPLETIMI 44: 6h e 15 giorni TRITON-TIMI 38: 6/15 mesi	PRINCIPLE-TIMI 44: l'inibizione media dell'aggregazione piastrinica è più bassa nei pazienti trattati con PPI; TRITON-TIMI 38: non vi sono differenze di incidenza di eventi cardiovascolari nei pazienti trattati e non con PPI
-------------------------	---	--	---	--

L'insieme degli studi discussi offre un panorama di risultati eterogenei e controversi, dai quali non è possibile evincere con chiarezza se i PPIs interferiscano con l'azione antiaggregante di clopidogrel o meno e se tale interazione si traduca in un aumento significativo del rischio di eventi avversi cardiovascolari gravi.

L'uso di inibitori di pompa protonica in associazione a clopidogrel è raccomandato nei pazienti ad alto rischio, con precedente emorragia gastrointestinale e con fattori di rischio multipli, quali l'età avanzata, l'uso concomitante di altri anticoagulanti, steroidi, FANS, e l'infezione da H. Pylori, alla più bassa dose di farmaco e limitatamente al periodo in cui il paziente assume clopidogrel.

La somministrazione routinaria di PPIs nei soggetti a basso rischio di sanguinamento gastrointestinale non viene più raccomandata, in contrasto con quanto si leggeva nel primo documento di consenso emanato dalle stesse società scientifiche nel 2008.

Farmaci che agiscono sul CYP3A4:

Le interazioni tra farmaci che coinvolgono il CYP3A4 potrebbero potenzialmente diminuire la presenza del metabolita attivo nel sangue, seppur la questione rimane ancora oggi molto dibattuta. (N. Ferri et al 2013)

- **Bloccanti dei Canali al Calcio:**

Bloccanti del canale del calcio (CCBs) sono noti per la loro azione inibente a livello del CYP3A4. In uno studio pazienti sottoposti a PCI e in terapia con

Clopidogrel e con CCBs hanno evidenziato una diminuzione dell'inibizione piastrinica due volte maggiore del normale (dati raccolti con VASP PRI).

Ulteriori indagini sono però necessarie, poichè altri test hanno dato risultati discordanti. (Hulot *et al.* 2010)

- **Statine**

Alcune statine come la Simvastatina e l'Atorvastatina sono metabolizzate dal CYP3A4 e test *in vitro* hanno evidenziato un'alta incidenza nell'inibizione dell'azione del Clopidogrel.

Tuttavia *in vivo* non è stata confermata questa tendenza, una sub analisi dello studio CHARISMA ha confrontato pazienti in terapia con Clopidogrel + statine CYP3A4 metabolismo dipendenti vs Clopidogrel + statine CYP3A4 metabolismo indipendenti evidenziando che non vi erano differenze significative nei due gruppi. (Bhind, *et al.* 2008)

- **Ketoconazolo:**

Il Ketoconazolo è un agente antifungino, derivato imidazolico, potente inibitore del CYP3A4.

In soggetti sani la co-somministrazione con Clopidogrel ha come risultato una significativa diminuzione nella formazione del metabolita attivo e pertanto una copertura terapeutica non ottimale. (Hulot *et al.* 2011)

- **Rifampicina:**

La rifampicina è un antibiotico battericida del gruppo delle rifamicine, e un potente induttore metabolico del CYP3A4.

Uno studio condotto su individui sani ha evidenziato che il numero di recettori P2Y₁₂ bloccati era maggiore quando il Clopidogrel veniva co-somministrato con la Rifampicina. (Hulot *et al.* 2010)

Il numero di recettori non bloccati dopo 4h dalla somministrazione di 600 mg di Clopidogrel da solo passava da 248 ± 40 a 48 ± 24 in co-somministrazione da 266 ± 63 a 4 ± 2 .

Sebbene l'aspetto rimanga ancora da approfondire è certamente plausibile che l'induzione del CYP3A4 da parte della rifampicina, comportando una maggiore quota di metabolita attivo, porti ad un maggiore blocco del recettore P2Y₁₂.

- **NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatories)**

Uno studio clinico condotto su pazienti sani ha evidenziato che la somministrazione contemporanea di Clopidogrel e Naprossene aumenti il rischio di sanguinamento gastrointestinale. (*Siller-Matula et al 2014*)

Tuttavia non è del tutto chiaro se il fenomeno coinvolga tutta la classe di farmaci essendo ancora pochi gli studi di interazione con altri NSAIDs.

In mancanza di evidenze cliniche è comunque sconsigliata la co-somministrazione di Clopidogrel, NSAIDs o inibitori della COX-2.

Azione del fumo sul recettore CYP1A2

Lo stile di vita e l'alimentazione possono in qualche modo modificare il metabolismo di alcuni farmaci, in particolare è noto che il fumo è un induttore del CYP1A2, un enzima del fegato che marginalmente interessa l'attivazione del Clopidogrel.

Un paradossale aumento dell'inibizione piastrinica è stato osservato in fumatori in seguito alla somministrazione di Clopidogrel.

Lo studio PARADOX ha evidenziato una maggiore concentrazione di metabolita attivo e una riduzione di eventi ischemici nei fumatori rispetto ai non fumatori.

Altri studi non hanno invece evidenziato questa tendenza in seguito o a una dose di carico o a diverse dosi di mantenimento.

Il paradosso, secondo lo studio, risiede nel fatto che i fumatori sono più esposti a sviluppare un evento cardiovascolare avverso ma sono anche più propensi ad una terapia antiaggregante.

Altri studi in merito hanno dato risultati discordanti, in particolare si ritiene di fondamentale importanza l'analisi di fattori di comorbidità ed aspetti legati all'età e allo stile di vita del soggetto.

Avanzare l'ipotesi che il fumo possa in qualche modo incrementare il successo di una terapia antiaggregante è comunque da scoraggiare in ogni caso.(*Rollini et al. 2013*)

FATTORI POST-RECETTORIALI:

Disfunzione della Via di trasduzione PGE1/PGI2

Esistono diversi studi che dimostrano come i prostanoidi come PGI2 potenzino l'effetto degli antagonisti del recettore P2Y12, altri studi infine evidenziano come la resistenza al Clopidogrel sia associata a disfunzioni nella via di trasduzione della PGI2.

Poiché come abbiamo visto la via di trasduzione PGE1/PGI2 è coinvolta nel potenziamento dell'effetto antiaggregante a seguito dell'inibizione del recettore P2Y12, disfunzioni di questa via possono causare fenomeni di "resistenza" al Clopidogrel.

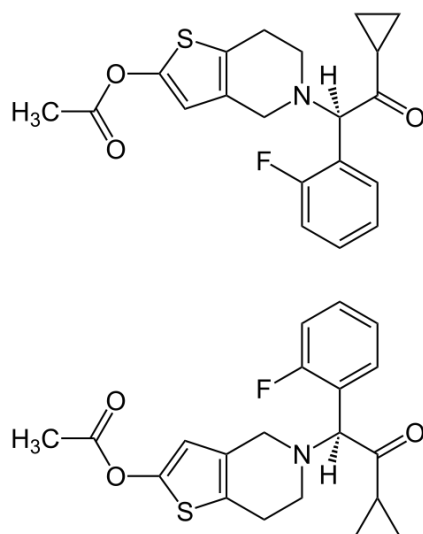
In particolare è stato osservata un'associazione tra pazienti con diabete, obesità o ischemia miocardica sintomatica e disfunzione della via di trasduzione PGE1/PGI2 AC mediata.(*Ferri et al 2013*)

Interazioni potenziali con la via di segnalazione NO

L'ossido nitrico (NO) è un composto gassoso prodotto principalmente dall'endotelio che gioca un ruolo importante nella regolazione dell'attività di inibizione piastrinica, riducendo la concentrazione di calcio intracellulare. NO attiva anche chinasi specifiche che inibiscono la liberazione di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana, con conseguente riduzione della produzione di TxA2. Diverse condizioni, come l'aterosclerosi ma anche il diabete mellito, l'ipercolesterolemia, l'ipertensione e il fumo, danneggiano l'endotelio, il quale può perdere la capacità di rilasciare NO. Questa disfunzione endoteliale genera anche maggiore quantità di specie reattive dell'ossigeno che inattivano l'NO. Le piastrine producono NO e, anche se il ruolo è minore rispetto all'NO prodotto dall'endotelio, il suo effetto inibisce il reclutamento delle piastrine in risposta ad attivazione. I fattori che inducono la disfunzione endoteliale possono anche compromettere la capacità delle

piastrine di produrre e rilasciare NO. L'insufficienza dell'NO che ne risulta contribuisce all'attivazione piastrinica e la conseguente trombosi arteriosa, che concorrono al fenomeno della resistenza.(*Ferri et al. 2013*)

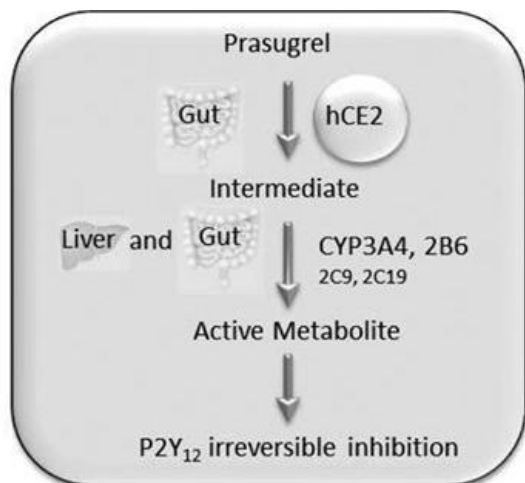
3. Prasugrel (Efient ®)



Prasugrel è una Tieno tetraidropiridina di terza generazione, è stato approvato dall'EMA per l'impiego clinico in Europa nel febbraio 2009. Il 10 luglio 2009 la Food and Drug Administration (FDA) ha approvato l'uso del Prasugrel per la prevenzione di eventi di origine aterotrombotica in pazienti adulti con sindrome coronarica acuta (ACS) (cioè angina instabile, infarto miocardico senza sopraslivellamento del tratto ST [UA/NSTEMI] o infarto miocardico con sopraslivellamento del tratto ST [STEMI]) sottoposti a intervento coronarico percutaneo (PCI) primario o ritardato.

❖ FARMACOCINETICA

Come il Clopidogrel è un pro farmaco che, in seguito ad attivazione, lega irreversibilmente il recettore P2Y₁₂ attraverso delle interazioni sulfidriliche.



Dopo l'assorbimento, quasi del tutto completo, le carbossiesterasi dell'intestino e del sangue idrolizzano la molecola in un tiolattone farmacologicamente inattivo che molto rapidamente viene trasformato, in un unico step, dal CYP3A4 e dal CYP2B6 e dal CYP2C19 e CYP2C9, in maniera più marginale, nel suo metabolita attivo.

Al contrario del Clopidogrel il Prasugrel presenta un più rapido e potente meccanismo d'azione dovuto a una via di inattivazione che non consuma la maggior parte della dose assorbita e al fatto che il processo di attivazione nell'intestino avviene in un unico passaggio.

Dopo una dose di carico di prasugrel di 60 mg, l'inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta dall'ADP si verifica a 15 minuti con 5 µM di ADP ed a 30 minuti con 20 µM di ADP. L'inibizione massima dell'aggregazione piastrinica indotta da ADP ottenuta con prasugrel è dell'83% con 5 µM di ADP e del 79% con 20 µM di ADP, in entrambi i casi con l'89% di soggetti sani e pazienti con aterosclerosi stabile che hanno raggiunto almeno il 50% di inibizione dell'aggregazione piastrinica entro 1 ora.

L'inibizione dell'aggregazione piastrinica ottenuta con Prasugrel mostra una ridotta variabilità inter- (9%) e intra-individuale (12%) sia con 5 µM che con 20 µM di ADP.

L'inibizione media dell'aggregazione piastrinica all'equilibrio è stata del 74% e del 69%, con 5 µM di ADP e 20 µM di ADP rispettivamente, ed è stata raggiunta dopo un periodo da 3 a 5 giorni di somministrazione di una dose di mantenimento di 10 mg di prasugrel preceduta da una dose di carico di 60 mg. Oltre il 98% dei soggetti ha avuto una inibizione dell'aggregazione piastrinica $\geq 20\%$ durante il dosaggio di mantenimento.

Dopo trattamento l'aggregazione piastrinica è ritornata gradualmente ai valori basali in un periodo di tempo da 7 a 9 giorni dopo la somministrazione di una singola dose

di carico di Prasugrel di 60 mg e in 5 giorni dopo la sospensione del dosaggio di mantenimento all'equilibrio.

❖ STUDI CLINICI SUL PROFILO DI SICUREZZA:

Il trial ACAPULCO ha valutato gli effetti farmacodinamici di 10mg di dose di mantenimento di Prasugrel in pazienti con UA e NSTEMI con 150 mg di dose di mantenimento di Clopidogrel in seguito a una dose di carico di 900mg.

In 14 giorni di terapia si è osservata una netta efficacia di Prasugrel rispetto a Clopidogrel.

La superiorità di Prasugrel rispetto a Clopidogrel è stata confermata anche nel trial di fase II PRINCIPLE-TIMI 44 in cui si è osservato che una dose di carico di 60mg di Prasugrel raggiunge il 90% di IPA in 2h, una dose di carico di 600mg di Clopidogrel necessita invece di 6h per raggiungere un IPA del 69%.

Nello studio di fase 3 TRITON si è valutata l'efficacia terapeutica di Prasugrel + ASA vs Clopidogrel + ASA.

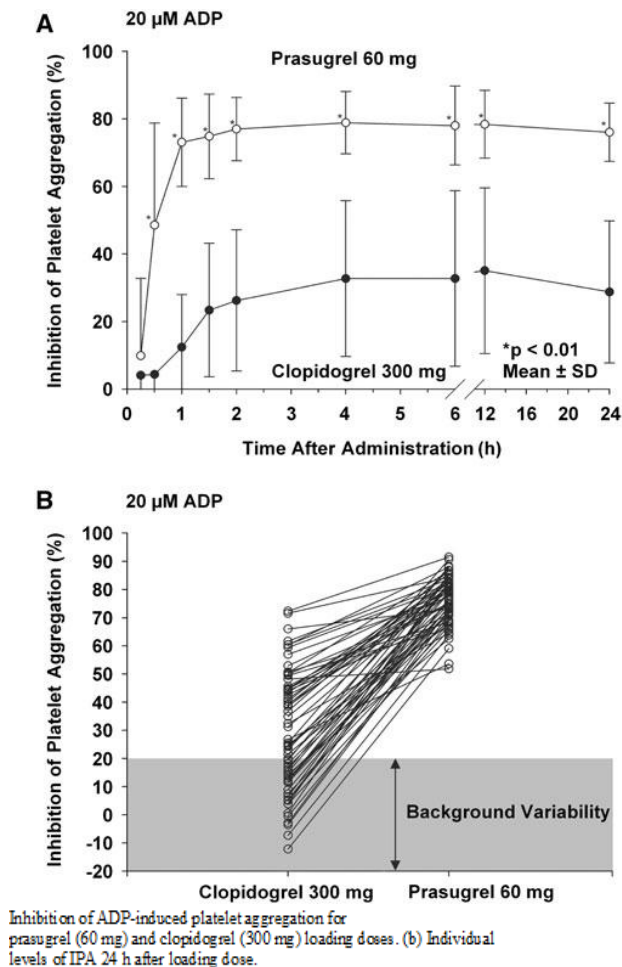
La Maggiore efficacia di Prasugrel è stata confermata anche in questo ambito ed indipendentemente dalla dose di ASA.

La sicurezza di Prasugrel è stata testata anche nel trial di fase due JUMBO-TIMI (Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally- Thrombolysis in Myocardial Infarction).

In questo test sono state comparate diverse dosi di Prasugrel (7.5 mg, 10mg, 15 mg) con Clopidogrel.

Dopo 30 giorni è stato riscontrato un maggiore, ma non significativo, livello di sanguinamento in pazienti trattati con Prasugrel.

Nonostante il possibile rischio di sanguinamento il trial TRITON-TIMI 38 (Trial to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet Inhibition



era del 2,4% contro l'1,1% di quello del Clopidogrel.

Le valutazioni positive sugli outcomes terapeutici hanno comunque portato ad approvare in Europa nel febbraio del 2009 l'impiego clinico del Prasugrel, specialmente grazie ai dati raccolti nello studio TRITON-TIMI 38.

Lo studio TRITON-TIMI 38 è stato molto utile per andare ad analizzare alcune peculiarità legate all'utilizzo del Prasugrel ed eventuali alterazioni della risposta terapeutica legate alla interindividualità:

- L'esposizione al Prasugrel è migliore del 42% in pazienti con peso ≤ 60 kg rispetto a pazienti con peso medio intorno agli 85 Kg; in una meta analisi è stato dimostrato che una diminuzione di 1 kg, in pazienti sani, è associata con un aumento in IPA di circa lo 0,26%.

with prasugrel Thrombolysis In Myocardial Infarction 38), nel quale sono stati valutati 13.608 pazienti con necessità di PCI e con rischio di ACS da moderato ad alto, ha evidenziato il sostanziale beneficio nell'utilizzo di Prasugrel rispetto a Clopidogrel.

Una dose di carico di 60 mg di Prasugrel, seguita da una di mantenimento di 10mg/die è stata associata con una diminuzione del 19% nell'end-point primario (morte cardiovascolare, MI fatale o non) rispetto a una dose di carico di 300 mg di Clopidogrel seguita da una di 75mg/die.

In questo caso il rischio di sanguinamento dovuto al Prasugrel

Pazienti con peso corporeo < 60 kg

Percentuali di sanguinamento maggiore o minore (TIMI) non correlato a intervento di bypass coronarico (CABG):

Peso	Prasugrel 10 mg	Clopidogrel 75 mg
<60 kg (N=664)*	10,1% (0% mortale)	6,5% (0,3% mortale)
≥60 kg (N=12672)*	4,2% (0,3% mortale)	3,3% (0,1% mortale)
≥60 kg (N=7845)**	2,2% (0,2% mortale) ^a	1,6% (0,2% mortale)
	Prasugrel 5 mg	Clopidogrel 75 mg
<60kg (N=1391)**	1,4% (0,1% mortale)	2,2% (0,3% mortale)

- In pazienti con età ≥ 75 anni è stata riscontrata una maggiore attività del Prasugrel, in particolare una maggiore tendenza al sanguinamento in questo gruppo ha fatto sì che sconsigliasse una terapia a base di Prasugrel in questi individui. Qualora il trattamento risulti indispensabile in seguito a una dose di carico di 60 mg si proseguirà con una di mantenimento più bassa (5 mg/die). Tuttavia, seppure gli studi hanno dimostrato la superiorità del Prasugrel nei confronti del Clopidogrel nella prevenzione di eventi ischemici, rimane la preoccupazione legata al persistere di una certa resistenza legata alla reattività piastrinica anche in terapia con il Prasugrel. È stato osservato che il 25,2% dei pazienti con ACS sottoposti a PCI presentavano una HTPR (PRI>50%) anche dopo una dose di carico di 60mg ed in più avevano una maggiore incidenza di MACE durante il primo mese.

In un piccolo studio condotto su 80 pazienti è stata dimostrata l'inefficacia di una seconda dose di carico di Prasugrel in pazienti con ACS sottoposti a PCI in seguito a una dose di 300mg di Clopidogrel. (*Lhermusier et al. 2014*)

Durante lo studio sono state usate diverse dosi di Prasugrel (10,30,60 mg) dopo 3 ore dalla somministrazione di Clopidogrel.

I valori rilevati sono stati i seguenti:

VASP-P PRI>60%

Verify-NOW PRU> 253

Seppure nessun paziente abbia raggiunto il livello di inibizione auspicato è stato comunque evidenziato come una dose da 30 mg sia la più indicata per ottenere la migliore inibizione possibile nell'arco delle 12-18 ore.

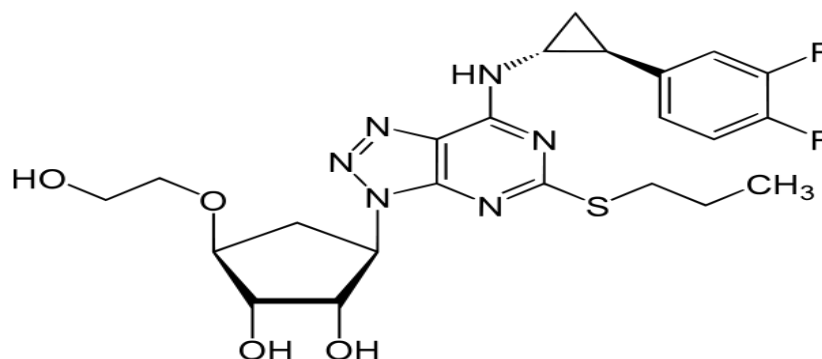
Il passaggio dalla terapia con Clopidogrel a quella con Prasugrel rimane una valida opzione per pazienti con ACS come dimostrato dallo studio SWAP.

Il beneficio nel cambio di terapia è stato osservato già 2 ore dopo una dose di carico di Prasugrel.

V. GLI INIBITORI REVERSIBILI DEL RECETTORE P2Y₁₂

La necessità di individuare una molecola con rapido inizio d'azione, breve emivita ed antagonista reversibile, sono stati messi appunto antagonisti diretti del P2Y₁₂ sono stati messi appunto:

4. Ticagrelor (BRILIQUE®)



Ticagrelor è un nuovo agente antiplastrinico e il primo orale, non-tienopiridinico reversibile. è indicato per la prevenzione di eventi aterotrombotici in pazienti adulti con Sindrome Coronarica Acuta (angina instabile, infarto miocardico senza innalzamento del tratto ST [NSTEMI] o infarto miocardico con innalzamento del tratto ST [STEMI]),

compresi i pazienti trattati farmacologicamente e quelli sottoposti a intervento coronarico percutaneo (PCI) o a impianto di by-pass aorto-coronarico (CABG).

❖ FARMACOCINETICA

Ticagrelor è un analogo dell'ADP che lega il recettore reversibilmente in maniera non competitiva in un sito diverso rispetto all'ADP e le tienopiridine.

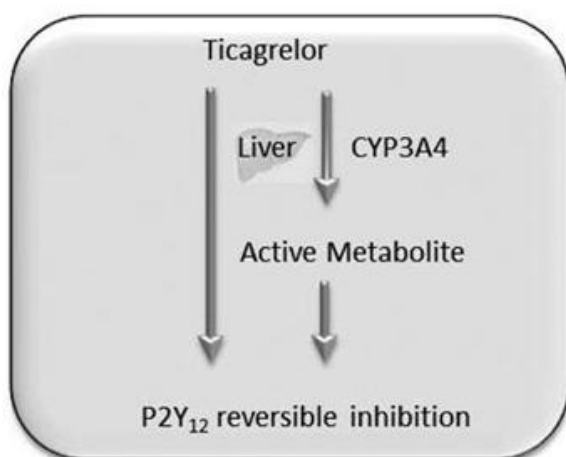
Il legame diretto con il recettore comporta una modificazione conformazionale tale che rende impossibile il legame con l'ADP, il processo rimane però reversibile.

Anche in questo caso il farmaco subisce un processo di attivazione che porta alla formazione di un metabolita attivo; tuttavia in questo caso sia la parent drug che il metabolita attivo mostrano un effetto antiaggregante. In seguito ad assorbimento il farmaco è rapidamente metabolizzato dal CYP3A4 in ben 10 diversi metaboliti derivato identificabili nel plasma, nel sangue, nelle urine e nelle feci.

La biodisponibilità è di circa il 40% e l'escrezione principalmente intestinale.

Non avendo pressoché metabolismo di attivazione rispetto alle tienopiridine, alterazioni genetiche e polimorfismi a livello dei citocromi influenzano relativamente l'attivazione del farmaco, per quanto riguarda invece alterazioni del gene ABCB1 codificante per la proteina di efflusso intestinale Pg-p in questo caso si potrebbero avere variazioni sull'assorbimento.

Lo studio PLATO (PLATlet inhibition and patient Outcomes), condotto per approfondire il ruolo di polimorfismi genetici a carico del gene ABCB1 e del CYP2C19, ha definitivamente confermato l'irrelevanza clinica di questo effetto nella terapia con Ticagrelor.



L'effetto del Ticagrelor è stato comparato con quello del Clopidogrel in pazienti con elevata espressione di polimorfismo per il gene ABCB1, ne è risultato che il gruppo del Ticagrelor non ha evidenziato aumento di eventi ischemici o sanguinamento, al contrario di quello trattato con Clopidogrel. (Van Giezen *et al.* 2007)

L'effetto antiaggregante è dose dipendente,

nei pazienti con coronaropatia stabile trattati con ASA, ticagrelor induce una rapida insorgenza dell'effetto farmacologico, come dimostrato da un'inibizione dell'Aggregazione Piastrinica (IPA) media per ticagrelor, 0,5 ore dopo una dose da carico di 180 mg, di circa il 41% con un effetto massimo sull'IPA dell'89 % entro 2-4 ore successive dalla dose, e mantenuto tra 2 e 8 ore. Il 90% dei pazienti presenta un'IPA finale >70% entro 2 ore dopo la dose.

❖ STUDI CLINICI:

- A parità di dose giornaliera di ASA, ticagrelor 90 mg due volte al giorno è risultato superiore a clopidogrel 75 mg/die nella prevenzione dell'endpoint composito di morte per cause cardiovascolari [CV], infarto miocardico [MI] o ictus, con la differenza guidata dalla riduzione di morti CV e MI. I pazienti ricevevano una dose di carico di clopidogrel da 300 mg (era possibile una dose da 600 mg in caso di PCI) oppure di ticagrelor da 180 mg.

Il risultato è stato raggiunto precocemente (Riduzione del Rischio Assoluto [ARR] 1,0% e Riduzione del Rischio Relativo [RRR] del 12% a 30 giorni), con un effetto del trattamento che si è mantenuto costante nei 12 mesi, ottenendo un'ARR dell'1,9% all'anno ed una RRR del 16%. Questi dati suggeriscono che è opportuno trattare i pazienti con ticagrelor fino a 12 mesi. Il trattamento di 54 pazienti affetti da SCA con ticagrelor invece che con clopidogrel eviterebbe l'insorgenza di un evento aterotrombotico; il trattamento di 91 pazienti eviterebbe una morte CV.

L'effetto del trattamento con ticagrelor rispetto a clopidogrel risulta coerente in tutti i sottogruppi di pazienti suddivisi per caratteristiche comprendenti peso, sesso, anamnesi di diabete mellito, attacco ischemico transitorio o ictus non emorragico, rivascolarizzazione, terapie concomitanti comprendenti eparine, inibitori GpIIb/IIIa ed inibitori della pompa protonica. (*Teng et al. 2012*)

- È stato condotto uno studio di comparazione tra l'effetto antiaggregante di Ticagrelor e Prasugrel in pazienti con STEMI. (*Teng et al. 2012*)

Il Risultato degli studi ha documentato che Prasugrel non era inferiore al Ticagrelor in termini di reattività residuale piastrinica 2h dopo la

somministrazione di una dose di carico tuttavia 8h dopo la somministrazione il PRU era invece significativamente minore nel gruppo di Prasugrel.

- È stato dimostrato che Ticagrelor, a differenza del Clopidogrel non presenta influenze legate a polimorfismi genetici del CYP2C19 e del ABCB1. Questo fa sì che si vada ad eliminare la necessità di uno screening genetico invece necessario prima di iniziare il trattamento con Clopidogrel.
(Teng *et al.* 2010)

❖ **AVVERTENZE PARTICOLARI:**

- **Bradicardia**

In seguito ad osservazioni di pause ventricolari per lo più asintomatiche in un precedente studio clinico, i pazienti con aumentato rischio di eventi bradicardici sono stati esclusi dallo studio principale PLATO che valutava la sicurezza e l'efficacia di Ticagrelor.

- **Dispnea**

Gli episodi di dispnea sono stati riportati dal 13,8% dei pazienti trattati con Ticagrelor e dal 7,8% dei pazienti trattati con clopidogrel. La dispnea è di solito di intensità da lieve a moderata, notturna e spesso si risolve senza richiedere l'interruzione del trattamento. I pazienti con asma/BPCO possono presentare un aumentato rischio assoluto di insorgenza di dispnea con. Se un paziente sviluppa dispnea di nuova insorgenza, prolungata o aggravata, questa deve essere approfonditamente studiata e, se non tollerata, il trattamento deve essere interrotto.

Entrambi gli effetti collaterali menzionati in precedenza sono tipici dell'Adenosina, pertanto è stato ipotizzato che la dispnea e la bradicardia osservata nei pazienti trattati con Ticagrelor fosse dovuta ad un'aumento delle concentrazioni di Adenosina nel plasma.

Uno studio prima condotto su modelli canini, poi su persone ha confermato che il ticagrelor è in grado di inibire il reuptake dell'adenosina negli eritrociti comportando un aumento della concentrazione nel sangue e un aumento dose dipendente della velocità del flusso sanguigno coronarico (CBFV).

Questi effetti off target, secondo gli studi riportati, sarebbero indipendenti dal blocco del recettore P2Y12. (*Van Giezen et al 2013*)

Gli stessi effetti sono stati osservati anche con una singola dose di carico di Ticagrelor da 180mg, in più è stato dimostrato che la dispnea può essere contrastata efficacemente nei soggetti in terapia con Ticagrelor attraverso la somministrazione di teofillina o antagonisti del recettore adenosinico.

Cattaneo e Faoni hanno invece ipotizzato che la dispnea sia dovuta ad una inibizione del recettore P2Y12 localizzato sui neuroni sensoriali e con un ruolo inibitorio sulla trasmissione neuronale, in particolare sulla via vagale mediata dalle fibre C.

Le cellule neurali, a differenza delle piastrine, presentano un nucleo e pertanto questo spiegherebbe la mancanza di dispnea causata dal Clopidogrel, la cui azione risulta transiente, rispetto a quella evidenziata con ripetuti dosaggi di Ticagrelor.

Un' inibizione del recettore comporta quindi una iperconduttività vagale fibre-C mediata e una sensazione di dispnea. (*Cattaneo et al 2012*).

- **Innalzamento della creatinina**

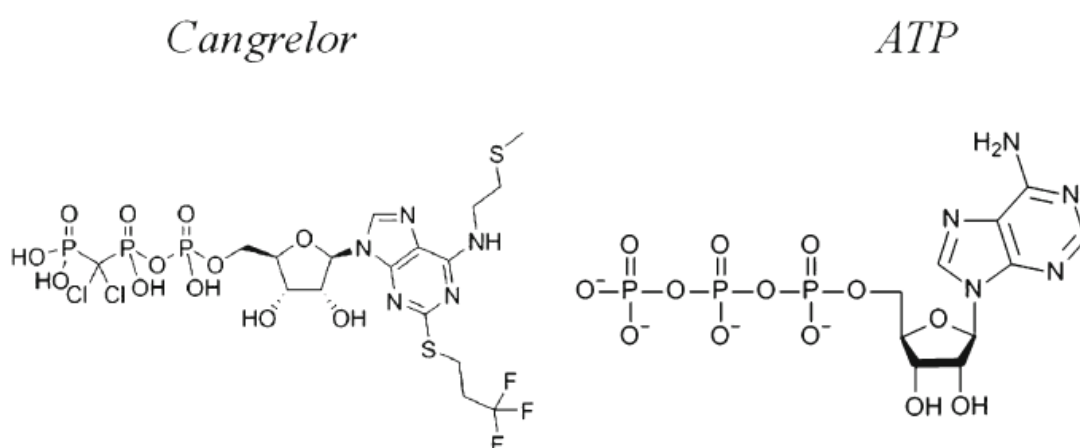
I livelli di creatinina possono aumentare durante il trattamento con Ticagrelor sebbene anche in questo caso il meccanismo non sia stato chiarito. La funzionalità renale deve essere controllata dopo un mese, ponendo particolare attenzione ai pazienti ≥ 75 anni, ai pazienti con insufficienza renale moderata/grave e a quelli che ricevono un trattamento concomitante con antagonisti dell'angiotensina II.

- **Aumento dell'acido urico**

Nello studio PLATO i pazienti che assumevano ticagrelor hanno avuto un rischio più alto di iperuricemia rispetto a quelli che hanno ricevuto

clopidogrel Deve essere prestata cautela quando ticagrelor viene somministrato a pazienti con storia di iperuricemia o artrite gottosa. Come misura precauzionale, l'uso di ticagrelor in pazienti con nefropatia da acido urico non è consigliato.

5. Cangrelor



Cangrelor è un potente inibitore reversibile del recettore P2Y₁₂ analogo dell'ADP. Diversamente dalle altre tieno tetraidropiridine Clopidogrel e Ticlopidina, che sono pro-farmaci, Cangrelor è una molecola già attiva e non richiede trasformazioni da parte del fegato.

Il farmaco inoltre viene somministrato per via endovenosa a differenza delle altre specialità analizzate fin ora.

Il legame al recettore comporta una variazione nella conformazione dello stesso e pertanto una inibizione reversibile.

❖ FARMACOCINETICA:

L'insorgenza d'azione è molto rapida (qualche minuto) e si ha massima inibizione dopo 15 minuti. Quando somministrato sotto forma di bolo per infusione la massima inibizione è raggiunta in 30 minuti e la normalizzazione dell'attività delle piastrine, in seguito a sospensione, in 60 minuti in virtù della sua breve emivita (3-6 min). (Bhatt *et al* 2013)

❖ STUDI CLINICI:

Grazie a questo particolare profilo farmacocinetico Cangrelor potrebbe esser impiegato come strategia ponte in pazienti che si devono sottoporre ad un bypass coronarico o che necessitano di un'operazione di urgenza e che hanno un DESs ("stent medicati" drug eluting stents); in questa classe di individui il rischio di sanguinamento durante l'operazione con una terapia di Clopidogrel è molto elevato, per cui passare a una terapia con Cangrelor potrebbe risultare una strategia vincente.

Questa possibilità è stata avvalorata da uno studio BRIDGE (*Marino et al. 2014*) pubblicato sul *Journal of the American Medical Association* nel Gennaio 2012 in cui si è confrontato l'inibizione piastrinica su 210 pazienti in seguito al passaggio randomizzato al Cangrelor o al Placebo in pazienti in terapia con tienopiridine prima di un intervento cardiaco.

La terapia con tienopiridine veniva interrotta tra le 48h e i 7 giorni prima dell'intervento e l'infusione di Cangrelor sospesa tra 1 o 6 ore prima dell'operazione

I risultati iniziali dimostrarono l'efficacia del Cangrelor nella riduzione di eventi ischemici e in complicazioni peri-procedurali della PCI, senza significativo incremento del sanguinamento.

Da studi collaterali emerse che il Cangrelor influenzava l'abilità del metabolita attivo del Clopidogrel o del Prasugrel di inibire irreversibilmente la funzionalità piastrinica, in particolare si osservò che:

- Pre-incubazione di sangue con Cangrelor prima dell'aggiunta delle tienopiridine riduce la capacità di queste di antagonizzare il recettore P2Y₁₂.
- Aggiunta di Cangrelor in sangue pre-incubato con tienopiridine porta ad una sostenuta inibizione delle piastrine.
- La co-somministrazione dei due farmaci porta ad una riduzione sull'inibizione delle piastrine; Questo suggerisce un effetto

competitivo tra queste due sostanze: l'alta affinità del Cangrelor per il recettore potrebbe prevenire il legame del metabolita attivo della tienopiridina al P2Y₁₂.

Questi primi studi sono stati tuttavia smentiti dalla FDA che il 12 febbraio 2014 ha scoraggiato l'utilizzo della "terapia ponte" evidenziando che seppur l'endpoint primario si era dimostrato positivo con un PRU<240 (con VerifyNow; Accumetrics, San Diego, CA) rispetto al placebo, in realtà i valori di reattività piastrinica registrati si possono ottenere indipendentemente da un pre-trattamento con tienopiridine e dalla dose e tempo di sospensione.

L'approvazione all'uso di Cangrelor risulta sempre meno probabile in virtù di altri studi che hanno portato ad evidenziarne la minor sicurezza per quanto riguarda il problema del sanguinamento in pazienti in PCI.

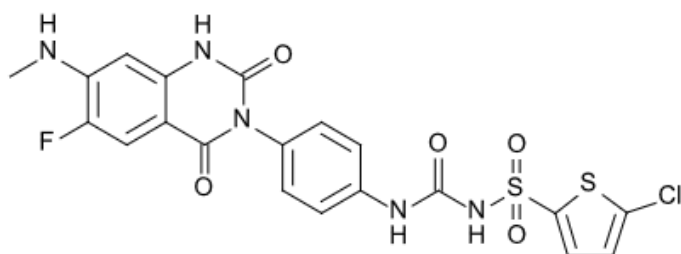
Lo studio CHAMPION-PHOENIX (Marino *et al.* 2014) aveva analizzato all'incirca 11.000 pazienti sottoposti a PCI e trattati casualmente con un bolo per infusione di Cangrelor o una dose di carico di Clopidogrel di 600mg o 300mg per un massimo di 30 giorni.

Al termine dello studio si era evidenziata una riduzione degli eventi ischemici nel gruppo trattato con Cangrelor ma nello stesso una tendenza al sanguinamento maggiore rispetto al gruppo trattato con Clopidogrel; tuttavia la differenza era poco significativa.

Una meta-analisi presentata nel Settembre del 2013 condotta su 25.000 pazienti sfruttando 3 trials clinici (PHOENIX, PCI e PLATFORM) ha in fine scoraggiato l'utilizzo di Cangrelor nella popolazione di pazienti in PCI in quanto i risultati sul rischio di sanguinamento sono maggiormente allarmanti se confrontati con Clopidogrel.

Rimane quindi incerto quale possa essere l'applicazione terapeutica migliore per il Cangrelor, certamente, nonostante il Panel negativo della FDA, il dibattito in merito non si è ancora concluso.

6. Elinogrel



Elinogrel è un inibitore selettivo del recettore P2Y₁₂ che compete direttamente con l' ADP per il legame al sito recettoriale. Come il Cangrelor non necessita di attivazione metabolica; è disponibile sia per uso endovenoso che per OS senza sostanziali differenze sull'outcome finale.

La somministrazione per via endovenosa fa sì che l'effetto antiaggregante sia raggiunto in tempi rapidi, mentre la somministrazione per OS meglio si presta ad una terapia cronica.

In seguito ad una dose orale di 50mg di ¹⁴C-elinogrel il 56% del farmaco è stato rintracciato nelle urine mentre il 48% nelle feci. La via metabolica prevalente è la demetilazione, che conduce alla forma PRT06030, la maggiore riscontrata sia nel plasma che nelle urine. (*Hutchaleelaha et al., 2008*)

❖ Studi Preclinici

In vivo Elinogrel ha evidenziato un effetto antitrombotico dose dipendente, in particolare a concentrazioni plasmatiche elevate ha dimostrato un effetto terapeutico migliore del Clopidogrel (*Andre et al., 2007*)

In studi preclinici ha inoltre dimostrato un più ampia finestra terapeutica (minor sanguinamento per equivalente attività antitrombotica) rispetto alle tienopiridine, probabilmente dovuta al suo meccanismo competitivo e reversibile d'azione.

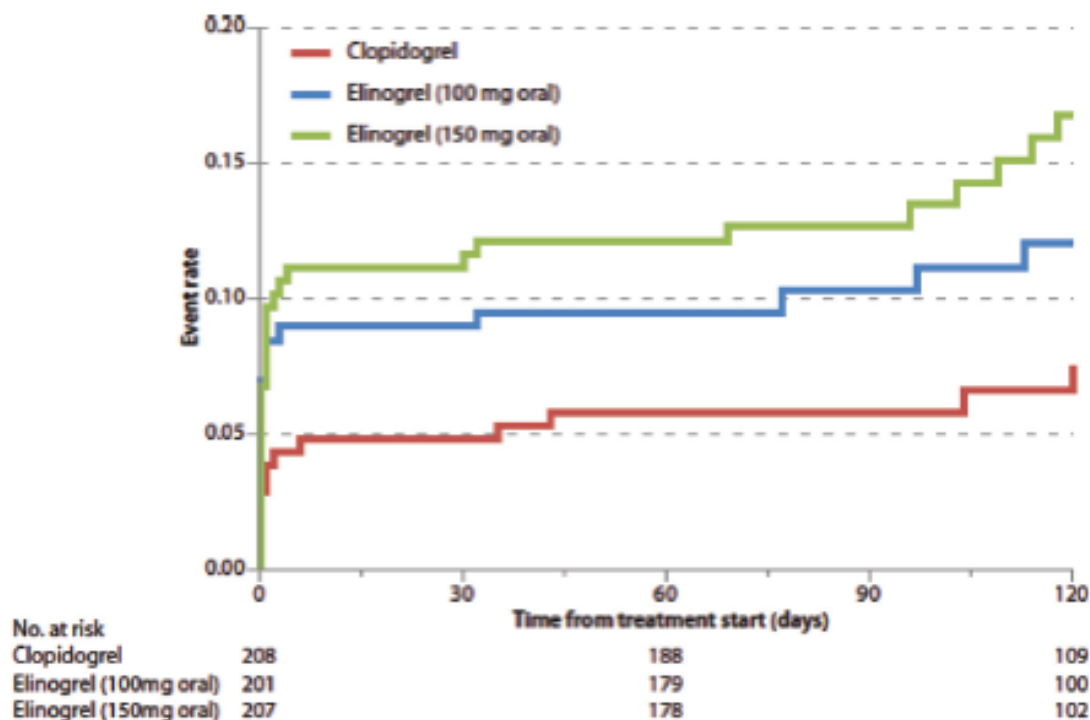


Figura 1-Confronto tra Clopidogrel ed Elinogrel nello studio INNOVATE-PCI in cui sono evidenziati gli eventi di sanguinamento

❖ Studi Clinici

In uno studio farmacodinamico una singola dose orale di Elinogrel in pazienti sottoposti a PCI ha dimostrato di superare L'HPR che condizionava la risposta del Clopidogrel. (Gurbel et al. 2008).

Nello studio di fase II INNOVATE-PCI (figura 1) è stato condotto un trial randomizzato per valutare l'effetto della somministrazione orale di tre diversi dosaggi di elinogrel a confronto con l'uso del Clopidogrel prima di un intervento di PCI in pazienti con STEMI.(Leonardi et al. 2010)

I risultati dello studio hanno dimostrato che l'uso di Elinogrel comparato con dosi di carico standard di Clopidogrel presenta un migliore profilo di sanguinamento per quel

che riguarda il PCI TIMI BRMA (bleeding requiring medical attention) tuttavia non sono state riscontrate significative differenze in TIMI per quel che riguarda maggiore o minore sanguinamento.

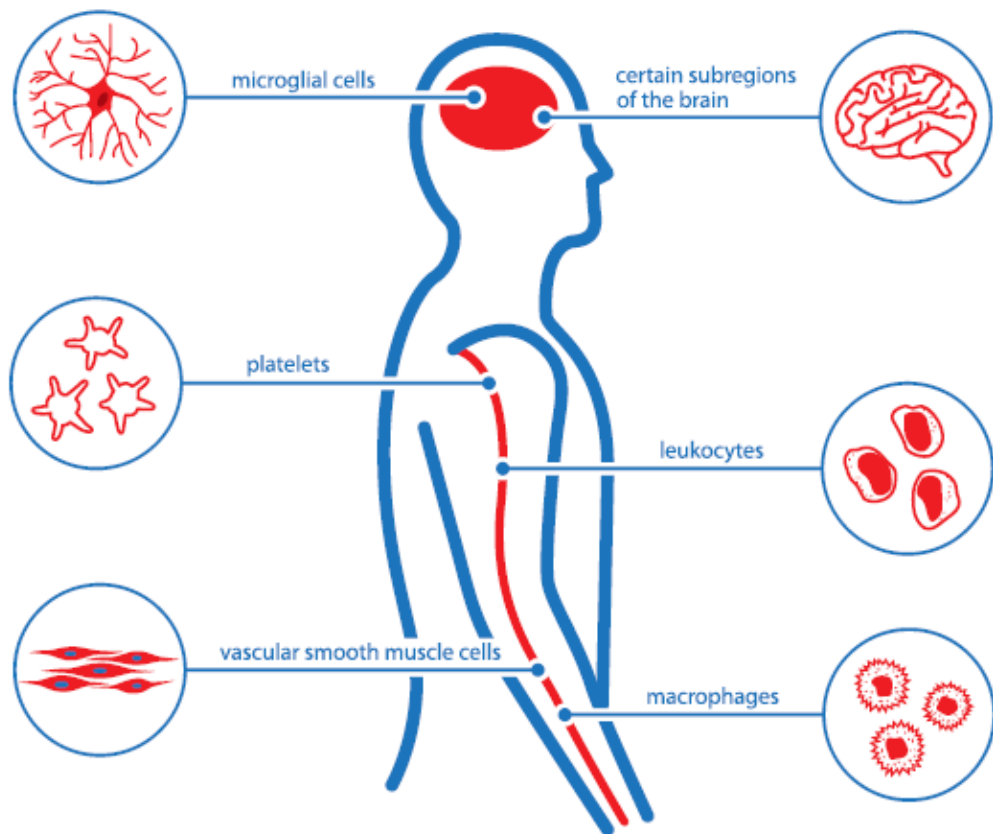
Non è ben chiaro se il migliore -PCI TIMI BRMA possa o meno predire un rischio maggiore o minore di sanguinamento; sono necessari ulteriori studi di fase III.

(Welsh et al. 2012)

L'interesse per il farmaco è soprattutto per le fasi acute della terapia, dove grazie alla sua formulazione iniettiva può garantire un'attività antiaggregante quasi immediata. Questa attività, che si combina con un'azione reversibile sulle piastrine, lo rende particolarmente interessante per i pazienti che devono essere sottoposti a interventi di angioplastica e di chirurgia maggiore. Inoltre la disponibilità anche della formulazione orale può consentire al paziente di utilizzare sempre lo stesso farmaco anche quando esce dalla fase operatoria più critica.

Ad oggi è in corso uno studio di fase III che arruola oltre 24mila pazienti iniziato nel primo quadrimestre del 2011, che valuterà in pazienti post infartuati e con angina stabile due diverse dosi di farmaco somministrate in associazione all'aspirina rispetto alla sola aspirina. Avrà una durata di circa 30 mesi (sarà "*event driven*" e quindi la durata non è prefissata) Se i risultati saranno positivi, il deposito del dossier registrativo potrebbe avvenire verso la fine del 2014.

VI. Direzioni Future: Quale il ruolo degli inibitori del P2Y₁₂ sull'Aterosclerosi?



Poichè il P2Y₁₂ è espresso non solo a livello delle piastrine ma anche in cellule e tessuti coinvolti nell'infiammazione e nell'aterosclerosi può essere considerato un ottimo bersaglio nella prevenzione dei processi aterosclerotici.

L'infiammazione gioca un ruolo fondamentale nella progressione del processo aterotrombotico e le piastrine sono le cellule principalmente coinvolte in questo meccanismo.

L'inibizione del P2Y₁₂ potrebbe avere come effetto benefico finale non solo l'inibizione dell'aggregazione piastrinica ma anche la riduzione della risposta immuno-mediata implicata nella patogenesi del processo aterosclerotico.

Recentemente alcuni studi hanno dimostrato che:

- il metabolita attivo del Prasugrel causa una rapida e consistente inibizione dei markers trombo stimolatori ADP-dipendenti dell'attivazione piastrinica (*Totani et al. 2012*)
- il Clopidogrel abbassa il livelli di P-selectina delle piastrine e riduce la formazione di aggregati di leucociti e piastrine, (*Afek A, et al 2009*) in più in uno studio su modelli di ratto con MI attenua la via di infiammazione indotta dal liposaccaride (LPS- induced sistem inflammation) e riduce la densità delle cellule pro-infiammatorie.(*Schulz et al 2008*)

Alcuni studi hanno evidenziato che il recettore P2Y12 è espresso anche in cellule della muscolatura liscia dove ne regola la contrattilità; in particolare si sono riscontrate maggiori concentrazioni in pazienti con MI piuttosto che in quelli con Angina Pectoris. Questa scoperta ha fatto sì che si attribuisse un ruolo chiave al recettore nella regolazione della proliferazione e migrazione durante il processo di formazione della placca sclerotica (*Rauch BH, et al 2010*)

Studi condotti su pazienti con patologie aterotrombotiche hanno dimostrato che il Clopidogrel è coinvolto nella riduzione del CD40 (CD154),della proteina C reattiva (CRP), della P-selectina, dell'interazione delle piastrine con i leucociti .(*Afek et al 2009*)

È stato ipotizzato che l'HPR di pazienti in trattamento con Clopidogrel potrebbe esser dovuta alla mancanza del potenziale effetto pleiotropico anti infiammatorio del farmaco; *Malek et al 2007* in uno studio condotto su pazienti in trattamento con Clopidogrel hanno confrontato i livelli di CRP in seguito a STEMI in pazienti con HPR e senza ottenendo prove a favore di un effetto pleiotropico anti infiammatorio del Clopidogrel. (*Figura 1*)

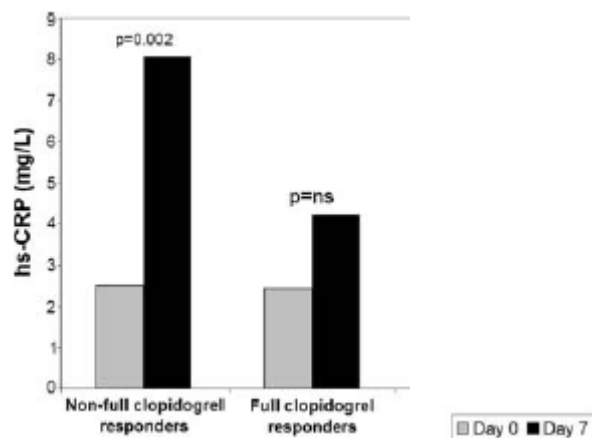


Figura 1

Il dato più eclatante che emerge da questi studi è la possibilità di giustificare l'interindividualità nella risposta al Clopidogrel non solo con un insufficiente inibizione piastrinica, ma anche con un inappropriato effetto anti infiammatorio del farmaco.

Per confermare queste prime rilevazioni ulteriori analisi con altre tecniche diagnostiche sono necessarie. (nello studio in questione è stato impiegato Platelet Function Analyzer (PFA)-100)

Questi studi sottolineano pertanto una certa implicazione a breve termine del recettore nei processi pro infiammatori ma non solo, se si considerano gli effetti a lungo termine dei recettori P2 sulla crescita, proliferazione e morte cellulare non è da escludere una qualche implicazione sia per quel che riguarda l'aterosclerosi che l'angiogenesi.

Altri studi farmacologici condotti su topi ApoE geneticamente modificati (modelli sperimentali di aterosclerosi) hanno tentato di dimostrare un'azione protettiva del Clopidogrel.

Si è osservato che l'inibizione del recettore P2Y12 riduce significativamente la gravità dell'ateroma e stabilizza le placche del seno carotideo, un effetto che potrebbe essere mediato dalla up regulation del pool delle cellule-T regolatorie e dalle cellule spleniche progenitrici, che, come dimostrato da *Sakaguchi et al 2004*, hanno un ruolo rilevante nella soppressione della risposta autoimmune. (*Afek A, et al 2009*)

Nello studio condotto da *Schulz et al 2008*, l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza per evidenziare l'adesione piastrinica intravascolare durante la rottura di una placca carotidea di un topo knockout per ApoE in seguito all'assunzione di Clopidogrel, ha

evidenziato una significativa riduzione dell'adesione piastrinica in seguito a rottura della placca.

Tuttavia l'effetto benefico si ottiene solo in caso di rottura della placca, infatti il Clopidogrel sembra inefficace nel prevenire l'adesione piastrinica sulla superficie infiammata dell'endotelio in assenza di lesione tissutale; un evento che sappiamo essere cardine nello sviluppo della lesione aterosclerotica.

Questi dati indicano pertanto che il Clopidogrel ha un ruolo minore nella prevenzione primaria ma diventi significativamente importante nella prevenzione di un secondo evento in seguito a distruzione del tessuto endoteliale vasale, inclusa la trombosi arteriosa.

Un ulteriore studio per testare la funzione biologica del recettore P2Y₁₂ nell'aterogenesi ha incrociato topi knockout per il recettore P2Y₁₂ e topi modificati per l'ApoE.(Wang *et al.* 2012)

In seguito a 20 giorni di dieta altamente lipidica l'analisi della lesione aterosclerotica ha evidenziato che nei topi privi di P2Y₁₂ rispetto agli ApoE la zona di lesione era decisamente minore e vi era una minore infiltrazione di monociti/macrofagi.

Il risultato finale sembra essere dovuto a una ridotta concentrazione dei livelli plasmatici di PF₄, una specifica chemochina presente all'interno degli α granuli piastrinici e direttamente coinvolta nel processo aterogenetico.

Ulteriori esperimenti condotti da Sachais BS, *et al* 2007 hanno confermato che P2Y₁₂ espresso sulle piastrine è un fattore chiave nei processi aterosclerotici in modelli sperimentali, ma non è da escludere un ruolo dello stesso recettore nelle cellule della muscolatura liscia.

Ultimamente studi pre clinici hanno indicato che l'inibizione del P2Y₁₂ potrebbe essere associata anche con effetti benefici sui processi di vasocostrizione.(Rauch *et al* 2010).

Poiché il recettore è altamente espresso nelle cellule della muscolatura liscia, più di altri recettori purinergici (P2Y₁₃ e P2Y₁), l'inibizione comporterebbe una diminuzione della contrazione ADP-indotta nelle cellule della muscolatura liscia vasale di segmenti aortici isolati.

In topi pretrattati con 50mg/kg di Clopidogrel la contrazione indotta con il derivato dell'ADP 2-Me-SADP è inibita.

Lo stesso effetto è ottenuto con 10 μ M di Ticagrelor in vitro.

Queste prove sembrerebbero attribuire all'inibizione del P2Y₁₂ una proprietà modulatoria sulla vaso reattività ADP- dipendente.

Ulteriori test sono sicuramente necessari per approfondire questo aspetto.

Infine uno studio recente ha dimostrato che il Prasugrel è in grado di ridurre la sintesi di TXA₂ e TNF α e di aumentare la quota NO derivati in topi trattati *in vivo* con endotossine.(Totani *et al.* 2012)

Complessivamente, tutte queste prove sperimentali evidenziano un ruolo assai rilevante del recettore P2Y₁₂ nella regolazione dei processi infiammatori alla base della aterosclerosi e nella biologia delle cellule della muscolatura liscia. La sua inibizione potrebbe determinare non solo un blocco dell'aggregazione piastrinica ma anche un effetto addizionale per quel che riguarda l'infiammazione delle cellule vascolari.

L'*outcome* clinico finale di questa possibilità rimane ancora tutto da esplorare e sono sicuramente necessari studi approfonditi in merito.

VII.CONCLUSIONI

Per il futuro sviluppo di un “perfetto” farmaco antiaggregante, dobbiamo tenere in considerazione i seguenti punti:

1. Passare da un singolo target a multi-targets
2. Indirizzarsi su multiterapie piuttosto che singole terapie
3. Cercare di scoprire in farmaci già approvati ulteriori applicazioni antiaggreganti
4. Cercare di orientarsi in farmaci con meccanismo d'azione reversibile.

Oltre la necessità di individuare nuovi farmaci sempre più efficaci si palesa sempre più il bisogno di terapie costruite su misura, in grado di massimizzare il beneficio terapeutico e minimizzare il rischio di sanguinamento o la non responsività.

L'impiego di tecniche per valutare l'attività piastrinica prima e durante la terapia, sommate agli studi genetici hanno permesso di migliorare notevolmente l'efficacia delle terapie in pazienti con ACS o sottoposti a PCI; tuttavia la molteplicità dei test a disposizione ed i risultati non sempre concordi derivanti dall'impossibilità di individuare valori di cut off universali rimangono un problema da superare.

Le direzioni future della ricerca dovranno pertanto andare di pari passo con lo sviluppo di tecniche diagnostiche sempre più precise ed affidabili.

BIBLIOGRAFIA

- **Afek A**, Kogan E, Maysel-Auslender S, et al. Clopidogrel attenuates atheroma formation and induces a stable plaque 1708 N. Ferri et al. phenotype in apolipoprotein E knockout mice. *Microvasc Res.* 2009;77(3):364–9.
- **Aleil B**, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005;3:85–92.
- **Andrew H.** et al. New insights into the haemostatic function of platelets. *British Journal of Haematology* 2009. 147: 415–430.
- **Bhatt DL**, Stone GW, Mahaffey KW, et al. Effect of platelet inhibition with cangrelor during PCI on ischemic events. *N Engl J Med.* 2013;368(14):1303-13.
- **Bhindi R**, Ormerod O, Newton J, et al. Interaction between statins and clopidogrel: is there anything clinically relevant? *QJM.* 2008;101(12):915–25.
- **Bonello L**, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:919–933.
- **Bouman HJ**, Parlak E, van Werkum JW, Breet NJ, ten Cate H, Hackeng CM, et al. Which platelet function test is suitable to monitor clopidogrel responsiveness? A pharmacokinetic analysis on the active metabolite of clopidogrel. *J Thromb Haemost* 2010;8:482–8.
- **Cattaneo M.** Laboratory detection of 'aspirin resistance': what test should we use (if any)? *Eur Heart J* 2007; 28: 1673-1675.
- **Cattaneo M.** Molecular defects of the platelet P2 receptors. *Purinergic Signal.* 2011;7:333–9.

- **Fabiana R.** & Francesco Franchi & Jung Rae Cho & Christopher DeGroat & Mona Bhatti & Elisabetta Ferrante & Ronakkumar Patel & Andrew Darlington & Antonio Tello-Montoliu & Bhaloo Desai & José Luis Ferreiro & Ana Muniz-Lozano & Martin M. Zenni & Luis A. Guzman & Theodore A. Bass & Dominick J. Angiolillo Cigarette Smoking and Antiplatelet Effects of Aspirin Monotherapy Versus Clopidogrel Monotherapy in Patients with Atherosclerotic Disease: Results of a Prospective Pharmacodynamic Study. *J Cardiovasc Transl Res.* 2014 Feb;7(1):53-63. doi: 10.1007/s12265-013-9535-3. Epub 2014 Jan 7.

- **Filippo C.** et al. Linee guida per la diagnosi e terapia dell'angina instabile. *Ital Heart J Suppl* 2000; 1 (12): 1597-1631.

- **Floyd CN,** Passacuale G, Ferro A. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of platelet adenosine diphosphate receptor antagonists and their clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2012;51(7):429–42.

- **Freyenhofer MK,** Bruno V, Willheim M, et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein- phosphorylation assay in patients on clopidogrel: does standardization matter? *Thromb Haemost* 2012; 107: 538-544.

- **Yang T.H,** Han-Young Jin, Kyu-Nam Choi, Ungjeong Do Randomized comparison of new dual-antiplatelet therapy (aspirin, prasugrel) and triple-antiplatelet therapy (aspirin, clopidogrel, cilostazol) using P2Y12 point-of-care assay in patients with STEMI undergoing primary PCI. *2013 Korean Circ J.* Mar 2014; 44(2): 82–88.

- **Hulot JS,** Collet JP, Montalescot G. Thienopyridine-associated drug-drug interactions: pharmacologic mechanisms and clinical relevance. *Curr Cardiol Rep.* 2011;13(5):451–8.

- **Husted S,** Storey RF, Harrington RA, et al. Changes in inflammatory biomarkers in patients treated with ticagrelor or clopidogrel. *Clin Cardiol.* 2010;33(4):206–12.

- **Göran K.** Hansson et al. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 352;16 April 21, 2005.

- **Kazui M**, Nishiya Y, Ishizuka T, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(1):92–9.

- **Kim JY**. Strategy for the treatment of clopidogrel low responsiveness in diabetes mellitus and stent implantation. *Korean Circ J.* 2009;39(11):459–61.

- **Kuliczkowski W**, Witkowski A, Polonski L, Watala C, Filipiak K, Budaj A, et al. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs *Eur Heart J* 2009;30:426-435.

- **Leonardi S**, Rao SV, Harrington RA, Bhatt DL, Gibson CM, Roe MT et al (2010) Rationale and design of the randomized, doubleblind trial testing INtraveNous and Oral administration of elinogrel, a selective and reversible P2Y₁₂-receptor inhibitor, versus clopidogrel to eVAluate Tolerability and Efficacy in nonurgent Percutaneous Coronary Interventions patients (INNOVATE- PCI). *Am Heart J* 160(1):65–72

- **Li D**, Wang Y, Zhang L, et al. Roles of purinergic receptor P2Y₁₂, G protein-coupled 12 in the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):e81–9.

- **Malek LA**, Grabowski M, Spiewak M, et al. Relation between impaired antiplatelet response to clopidogrel and possible pleiotropic effects. *J Thromb Thrombolysis* 2007; 24: 301-305.

- **Malloy J.** ,PharmD; AbirO. Kanaan, PharmD; Matthew A.Silva ,PharmD ,BCPS; Evaluation of Antiplatelet Agents for Secondary Prevention of Stroke Using Mixed Treatment Comparison Meta-analysis Rhynn and JenniferL.Donovan,PharmD, Volume 35, Issue 10, Pages 1490–1500.e7, October 2013.

- **N.L. Hurst** , V.B. Nooney , B. Raman^a, Y.Y. Chirkov , R. De Caterina , J.D. Horowitz Clopidogrel “resistance”: Pre- vs post-receptor determinants *Vascular Pharmacology*, Volume 59, Issues 5–6, November–December 2013, Pages 152-161.

- **Rang H.P.** Effetti dell'ischemia del miocardio. Farmacologia, Casa Editrice Ambrosiana, 2005.
- **Rauch BH**, Rosenkranz AC, Ermler S, et al. Regulation offunctionally active P2Y12 ADP receptors by thrombin in human smooth muscle cells and the presence of P2Y12 in carotid artery lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2434–42.
- **Sachais BS**, Turrentine T, Dawicki McKenna JM, et al. Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE^{-/-} mice. *Thromb Haemost.* 2007;98(5):1108–13.
- **Sakaguchi S.**, 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic selftolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 531–562
- **Schulz C**, Konrad I, Sauer S, et al. Effect of chronic treatment with acetylsalicylic acid and clopidogrel on atheroprogession and atherothrombosis in ApoE-deficient mice in vivo. *Thromb Haemost.* 2008;99(1):190–5.
- **Schrör K**, Huber K, Hohlfeld T. Functional testing methods for the antiplatelet effects of aspirin. *Biomark Med* 2011; 5: 31-42.
- **Springthorpe B**, Bailey A, Barton P, Birkinshaw TN, Bonnert RV, Brown RC, et al. From ATP to AZD6140: the discovery of
an orally active reversible P2Y12 receptor antagonist for the prevention of thrombosis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17: 6013–8.
- **Teng R**, Butler K. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y(12) receptor antagonist, in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010;66:487–96.
- **Teng R.** Pharmacokinetic, pharmacodynamic and pharmacogenetic profile of the oral antiplatelet agent ticagrelor. *Clin Pharmacokinet.* 2012;51(5):305–318.

- **Totani L**, Dell'Elba G, Martelli N, et al. Prasugrel inhibits platelet-leukocyte interaction and reduces inflammatory markers in a model of endotoxic shock in the mouse. *Thromb Haemost.* 2012;107(6):1130–40.

- **Van Giezen JJ**, Sidaway J, Graves P, et al. Ticagrelor inhibits adenosine uptake in vitro and enhances adenosine-mediated hyperemia responses in a canine model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2012; 17: 164-172.

- **Van Giezen JJ**, Nilsson L, Berntsson P, Wissing BM, Giordanetto F, Tomlinson W, et al. Ticagrelor binds to human P2Y(12) independently from ADP but antagonizes ADP-induced receptor signaling and platelet aggregation. *J Thromb Haemost.* 2009;7: 1556–65.

- **Varenhorst C**, James S, Erlinge D, et al. Genetic variation of CYP2C19 affects both pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel but not prasugrel in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2009;30(14):1744–52.

- **Wallentin L**. P2Y(12) inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J.* 2009;30(16):1964–77.

- **Wallentin L**, James S, Storey RF, et al. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet.* 2010;376(9749):1320–8.